

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/15732 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P 37/06, 29/00, 19/02

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05868

(22) 国際出願日: 2000年8月30日 (30.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/242672 1999年8月30日 (30.08.1999) JP  
特願2000/254680 2000年8月24日 (24.08.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 手塚克成 (TEZUKA, Katsunari) [JP/JP]; 渡部良広 (WATANABE, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内 Kanagawa (JP). 安部 良 (ABE, Ryo) [JP/JP]; 〒270-0101 千葉県流山市東深井869-17 Chiba (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR IMMUNOLOGICAL DISEASES

(54) 発明の名称: 免疫性疾患治療剤

(57) Abstract: It has been found out that antibodies against AILIM (also called JTT-1 antigen, JTT-2 antigen, ICOS and 8F4) exert significant therapeutic effects on joint diseases such as articular rheumatism and arthrosis deformans, graft-versus-host disease, transplantation immunological rejection, inflammation (hepatitis, inflammatory diseases, etc.) and symptoms in association with immune sensitization by a foreign antigen and the thus induced hyperproduction of an antibody against the antigen.

(57) 要約:

AILIM (JTT-1 抗原、JTT-2 抗原、ICOS 及び 8F4 と呼ぶ) に対する抗体が、関節リウマチや変形性関節症などの関節症、移植片対宿主病、移植免疫拒絶、炎症 (肝炎や炎症性腸疾患)、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う疾患症状に対して有意な治療効果を有することを見出した。

WO 01/15732 A1





- 1 -

## 明細書

## 免疫性疾患治療剤

技術分野

本発明は、AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule ; 別名を「JTT-1 抗原」、「JTT-2 抗原」、「ICOS (inducible co-stimulator)」または「8F4」という。) の生物活性、特に AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

具体的には、本発明は、AILIM 発現細胞の増殖を制御（例えば抑制）するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン 4 など）の産生を制御（例えば抑制）する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

さらに具体的には、本発明は、(1) 関節症（例えば、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)、変形性関節症 (osteoarthritis; OA)）を抑制、治療または予防するための医薬組成物；(2) 炎症（例えば、肝炎）を抑制、治療または予防するための医薬組成物；(3) 移植片対宿主反応 (graft versus host reaction; GVH reaction)、移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物；(4) 外来抗原若しくは自己抗原により惹起される免疫反応（例えば、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、サイトカインの産生など）を抑制または予防するための医薬組成物に関する。

背景技術

哺乳動物の生体は、体内に侵入した病原微生物（ウイルス、細菌、寄生虫など）や外来異物など（以下、併せて「抗原」と呼ぶ。）を排除しようとする免疫

- 2 -

応答システムを有する。その1つは、自然免疫応答システムと呼ばれ、他の1つは獲得免疫応答システムと呼ばれるものである。前者は、食細胞（多形核白血球、単球、マクロファージなど）による貪食、ナチュラルキラー（NK）細胞による攻撃、及び補体による抗原のオプソニン化などのような非特異的な認識による排除機構である。後者の獲得免疫応答システムは、該抗原に対する特異性を獲得（活性化）したリンパ球（主にT細胞、B細胞）による排除機構である。

抗原特異性を獲得したB細胞は、該抗原に特異的な抗体を産生することにより細胞外に存在する該抗原を攻撃する。抗原特異性を獲得（活性化）したT細胞は、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞（cytotoxic T cell; cytotoxic lymphocyte; CTL）に分類され、前者はB細胞の分化や抗体の産生を調節するとともに食細胞と協同して該抗原を破壊する。後者は、自らウイルス感染細胞などを攻撃する（実験医学（別冊）・「Bio Science 用語ライブラリー [免疫]」、羊土社、p. 14-17、1995）。

このT細胞による抗原特異性の獲得（活性化）は、T細胞が、マクロファージ、B細胞あるいは樹状細胞などの抗原提示細胞（antigen-presenting cells: APC）により提示される抗原を認識することにより開始される。抗原提示細胞は、取り込んだ抗原をプロセッシング（加工）し、この加工された抗原を主要組織適合性抗原複合体（MHC）に結合させて抗原提示する。T細胞は、抗原提示細胞により提示された該加工抗原を、その細胞膜表面に有するT細胞受容体（TcR）とCD3抗原との複合体（TcR/CD3複合体）を通じて認識することで細胞の活性化（特異性の獲得）のための第1のシグナルを受ける。

しかしながら、このTcR/CD3複合体を介した第1シグナルだけでは、T細胞の十分な活性化が起こらないだけでなく、その後を受ける如何なる刺激に対しても反応しなくなる不応答状態（unresponsiveness）またはクローン麻痺（clonal anergy）と呼ばれる状態に陥る。T細胞が活性化され抗原特異的なT細胞クローンに分化、増殖するためにはインターロイキン-2（IL-2）の自己分泌（オート

- 3 -

クリン；autocrine）が必要であるが、クローン麻痺の状態では IL-2 などが産生されず細胞分裂が起こらないため、T細胞が不活性化された状態となる。即ち、IL-2 などのサイトカインの産生を伴う T細胞の活性化には、TcR/CD3 複合体を介した第 1 シグナルに引き続く第 2 のシグナルを必要とする。この第 2 のシグナルはコスティミュレイトリーシグナル（副刺激シグナル；costimulatory signal）と呼ばれる。

T細胞は、T細胞表面上の TcR/CD3 複合体とは別の分子を介して抗原提示細胞上の MHC とは別の分子と相互作用（細胞間接着）することによりこの第 2 のシグナルを受け取り細胞内に伝達する。この第 2 のシグナルにより細胞のアナジー（クローン麻痺）が回避されるとともに細胞が活性化される。

抗原提示細胞と T細胞等のリンパ球との間の第 2 のシグナル伝達のメカニズムについては未だ詳細に解明されていない部分はあるものの、これまでの研究から、この第 2 のシグナル伝達には、主に T細胞及び胸腺細胞で発現する細胞表面分子である CD28（別名：Tp44、T44、又は 9.3 抗原）と抗原提示細胞（マクロファージ、単球、樹状細胞など）で発現する細胞表面分子である CD80（別名：B7-1、B7、BB1、または B7/BB1）及び同じく抗原提示細胞状の細胞表面分子である CD86（別名：B7-2 または B70）との間の相互作用（即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）が極めて重要であることが明らかにされている。

さらにこの第 2 のシグナルによる T細胞の活性化の制御には、該第 2 のシグナルに依存してその発現が増強されると考えられている CTLA-4（Cytolytic T lymphocyte associated antigen 4）と該 CD80(B7-1)及び CD86(B7-2)との間の相互作用（即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）も重要な役割を担っていることが実験的に明らかにされてきている。即ち、この第 2 のシグナルの伝達による T細胞の活性化の制御には、少なくとも CD28 と CD80/CD86 との間の相互作用、該相互作用に依存すると考えられる CTLA-4 の発現の増強、並びに CTLA-4 と CD80/CD86 との間の相互作用が包含されることが明らかにされてきている。

- 4 -

CD28 は、この T 細胞の活性化とアナジの回避に必要な第 2 のシグナル（コストимуレイトリーシグナル）を伝達するコストимуレイター分子であることが明らかにされている。この分子が抗原提示細胞上のコストимуレイター分子である CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) と結合すること（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）により伝達される第 2 のシグナルは、Th1 型サイトカインの mRNA を安定化させ、その結果 T 細胞からの IL-2、IFN $\gamma$  及び TNF $\alpha$  などの Th1 型サイトカインを大量の産生を促す。一方、CTLA-4 は、TcR/CD3 を通じて入る第 1 シグナルにより発現が誘導されるとともに、CD28 と CD80 との結合により入る該第 2 のシグナルによってもその発現が増強されることが知られている。CTLA-4 は、それらのシグナルを受けて、CD28 より入る第 2 のシグナルによる T 細胞の活性化とは反対に T 細胞機能に対して抑制的に働くことが明らかになってきている。

ヒトの CD28 及び CTLA-4 は、各々 44kD 及び 41 乃至 43kD の分子量を有する I 型糖蛋白質である。ともに免疫グロブリン様ドメイン 1 個を有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞間接着分子としての機能と細胞内へのシグナル伝達分子としての両方の機能を併せ持った分子である。

ヒト CD28 はジスルフィド結合によりホモ二量体を形成し、一方、CTLA-4 は単量体で存在することが示されている。CD28 及び CTLA-4 の遺伝子の染色体上に位置は、ヒトにおいてはいずれも「2 q 3 3」、またマウスにおいては「1 C」であり、いずれも 4 つのエクソンからなる。ヒトの CD28 及び CTLA-4 は、リーダー配列を含め各々 220 及び 223 個のアミノ酸から構成され、両者のアミノ酸相同性は 20 乃至 30 % 程度である。

CD28 及び CTLA-4 のリガンドは、ヒト及びマウスにおいて CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) であることが解明されている。CTLA-4 は、いずれのリガンドに対しても CD28 より親和性が高く、その差は約 20 倍である。CD28 及び CTLA-4 の CD80 (B7-1) への結合には、動物種を超えて保存されているアミノ酸配列構造であ

る「MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr)」が重要であることが明らかにされている。また、CD28 が刺激を受けると、その細胞内の部分配列「YMM (Tyr-Met-Asn-Met)」内のリン酸化されたチロシン残基へ PI3 キナーゼ (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) が会合することが示され、CD28 はこの「YxxM」構造を介して細胞内シグナル伝達において重要な働きをしていることが示されてきている。また、CTLA4 の細胞内領域にも「YxxM」で表わされる配列、即ち「YVKM (Tyr-Val-Lys-Met)」を有しており、刺激を受けた後、この配列に SYP が会合することが示されている。

CD28 は、胸腺細胞及び末梢血 T 細胞に局限して発現し、一方 CTLA-4 は活性化 T 細胞に特異的に発現することがわかってきている (細胞工学・別冊「接着分子ハンドブック」、秀潤社発行、第 93-102 頁、1994 年； 同誌、第 120-136 頁；

実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・免疫」、羊土社発行、第 94-98 頁、1995 年； 実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・細胞内シグナル伝達」、羊土社発行、第 58-59 頁、1997 年； 日本臨床、第 55 巻、第 6 号、第 215-220 頁、1997 年)。

このようにして T 細胞機能の制御 (T 細胞の活性化及び機能抑制) におけるコスティミュレーター分子 (CD28、CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) など) 並びに連動する CTLA-4 などの複数の分子の間の相互作用 (換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着) の重要性が提唱されるようになり、それらの分子と疾患との関係の解明、並びにそれらの分子の機能を制御することによる疾患の治療の試みが注目されるようになってきている。

前述のように、生体は、生体 (自己) にとって異物である抗原に対しては獲得免疫応答システムを作動させるが、自己の生体成分 (自己抗原) に対しては免疫応答を示さない免疫寛容を有している。しかしながら、何らかの原因で免疫寛容の破綻が起これば、自己抗原に対する免疫応答が起こり前述と同様のメカニズム

- 6 -

により自己抗原反応性 T 細胞が誘導され免疫異常状態に陥り、種々の自己免疫疾患が惹起される。

即ち、生体の免疫システムが正常な状態では、正常組織の無刺激の抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) はコスティミュレイトリー分子を発現しないため、例え自己抗原に反応する自己抗原反応性 T 細胞が存在していても、T 細胞が不応答状態に陥っているため自己寛容が維持されているが、免疫異常状態においては過剰または継続的なコスティミュレイトリー分子の発現以上により自己抗原反応性 T 細胞が活性化され自己免疫疾患が惹起されるという可能性が提示されている。

このような観点から近年、コスティミュレイトリーシグナルの伝達、例えば前述の CD28/CTLA-4-CD80/CD86 の間のシグナル伝達を調節することにより種々の自己免疫性疾患の治療の試みが多数なされてきている。

しかしながら、そのような治療の試みがなされる一方で、コスティミュレイトリー分子及び関連する分子との間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）による T 細胞の活性化のメカニズムの詳細な説明は未だなされておらず、またこのメカニズムには未だ同定されていない他の分子が関与する可能性も残っている。

最近本発明者らは、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T 細胞等のリンパ球の活性化に必須な第 2 のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化 T 細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規な哺乳動物（ヒト、マウス及びラット）由来の細胞膜表面分子を同定及び単離することに成功し、その分子を「JTT-1 抗原」または「JTT-2 抗原」と命名した（日本国特許出願公開 11-29599 号公報；国際特許出願公開 W098/38216 号；Int. Immunology, Vol.12, No.1, p.51-55, 2000）。なお、後に本発明者らはこれらの分子を ALLIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule) と改名した。

- 7 -

本発明者らによるこれまでの研究から、この新分子 AILIM について下記のような知見が得られている。

(1) T細胞の活性化に重要なコスティミュレトリーシグナルを細胞間接着を介して伝達する T細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CD28」並びに該シグナルに連動して活性化 T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う T細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CTLA-4」と下記のような類似性を有する。

①システイン残基を含む 20 以上のアミノ酸残基が良く保存されている。

②リガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro (PPP)」が細胞外領域に保存されている。

③シグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM) (Xaa 及び x は任意のアミノ酸を意味する。）」が細胞内領域に保存されている。

④「マウス AILIM (マウス JTT-1 抗原)」をコードする遺伝子のマウス染色体上での位置は、マウスの「CD28」及び「CTLA-4」の位置と同く、「1 C 3」である。

(2) 細胞間接着を媒介する機能を有する「CD28」及び「CTLA-4」と同様に、「AILIM (JTT-1 抗原)」は胸腺細胞、ConA などのマイトジェンで刺激したリンパ芽球及び胸腺腫細胞の細胞間接着を媒介する能力を有する。

(3) AILIM は、少なくとも胸腺細胞、ConA などのマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞 (活性化 T リンパ芽球細胞や活性化 B リンパ芽球細胞)、末梢血リンパ球及び胸腺腫細胞で強く発現する。

(4) AILIM (JTT-1 抗原) に対する抗体は、ヒト末梢血リンパ球を有意に増殖させ、またその増殖は、T細胞の活性化に必須な抗原提示細胞からの第 1 のシグナルを受け取る T細胞上の TcR/CD3 複合体を構成する CD3 に対するモノクローナル抗体を共存させることによりさらに高い増殖を誘導する。

(5) AILIM (JTT-1 抗原) に対する抗体を、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に投与することにより、その病状が抑制される。

- 8 -

(6) AILIM (JTT-1 抗原) に対する抗体を、糸球体基底膜 (GBM) 腎炎のモデルラットに投与することにより、その病状が抑制される。

本発明者らによる AILIM の同定及び性状解析の報告より後になって、クロチェク (Kroczeck) らのグループにより、ヒト由来の AILIM と同一の分子である ICOS (inducible co-stimulator) または 8F4 と命名した分子の同定の報告がなされている (Nature, Vol.397, p.263-266, 1999、及び国際特許出願公開 W099/15553 号)。

AILIM (別名: JTT-1 抗原、JTT-2 抗原、ICOS、または 8F4) については、上述の報告があるのみであり、その生物学的機能並びに疾患との関わりについては未だ詳細に解明されていない。

一方、極最近になって、この副刺激伝達分子 AILIM と相互作用するリガンドと考えられる B7h、B7RP-1、GL50 あるいは LICOS と称される新規分子も同定されている (Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000)。

これら 2 種類の新規な分子、即ち、AILIM (ICOS) と B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS) の同定により、上述した T 細胞等のリンパ球の活性化及び活性化 T 細胞の機能制御に必須であるコスティミュレイトリーシグナルの伝達経路には、これまで知られていた CD28 と CD80(B7-1)/CD86(B7-2) との間のシグナル伝達経路、及び CTLA4 と CD80(B7-1)/CD86(B7-2) との間のシグナル伝達経路である第一及び第二の経路の他に AILIM (ICOS) と B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS) との相互作用による新しい第三の経路があることが判明することとなった。

この新しい 2 つの分子の各々の生物学的機能、該分子による第三のコスティミュレイトリーシグナル伝達による T 細胞等のリンパ球の機能制御、並びに該新規なシグナル伝達と疾患との関連性については、目下精力的に研究が進められているところである。



### 発明の開示

即ち、本発明は、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル（コスティミュレトリシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規分子 AILIM の生物学的機能並びに AILIM の発現と疾患との関わりを明らかにするとともに、該 AILIM の生物学的機能を医学及び薬学的手法（例えば、低分子化合物及び抗体等の薬剤）により制御することにより AILIM の発現の状態に依存する種々の疾患の発症を抑制し、または該疾患を治療する方法及び薬剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、哺乳動物の AILIM の生物学的機能、AILIM の種々細胞での発現の状態、及び AILIM の発現と疾患との関連性に関して、鋭意研究を重ねた結果、上述したこれまでに得られている AILIM に関する知見に加えて、さらに下記知見を見出し本発明を完成するに至った。

(I) 正常マウスのリンパ組織の一つである胸腺のT細胞においては、CD3の発現の高い細胞で同様に AILIM の高い発現が見られ、両者の発現は相関性が認められる。一方、対照的に、コスティミュレトリ分子である CD28 の発現は CD3 の発現が高いほど低下していた。マウス正常胸腺T細胞においては、AILIM の発現と CD28 の発現は相反する動態を示した。正常マウス胸腺由来T細胞においては、CD4 陰性 CD8 陰性 T 細胞では、AILIM 及び CD28 ともにその発現が認められない。正常マウス胸腺由来T細胞においては、CD28 の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性 T 細胞で最大となり、その後の細胞分化を経た CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞または CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞においてその発現が減少する。一方、正常マウス胸腺細胞においては、AILIM の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性 T 細胞では僅かしか認められないものの、その後の細胞分化を経た CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞または CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞で高い発現が認められる。正常マウス胸腺T細胞における AIL

- 10 -

IMの発現は、CD3だけでなくCD4及びCD8の発現との相関性の点においてもCD28の発現とは異なるものである。

(II) 正常マウスのリンパ組織の一つである脾臓及びリンパ節のT細胞におけるAILIMの発現は、マウス胸腺由来T細胞での発現と比べ僅かであり、CD4陽性T細胞の極少数（CD4陽性T細胞の約1乃至3%）においてAILIMの発現が認められる。

(III) *P. acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及びLPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導したマウス肝炎モデルの肝臓組織由来T細胞（単核細胞）においては、AILIMの顕著な発現が認められる。その発現は正常マウス脾臓由来のCD4陽性細胞またはリンパ節由来T細胞でのAILIMの発現に比べ著しく高いものである。

(IV) 健常人の末梢血由来細胞においては、AILIM陽性細胞のほとんどがCD4陽性CD8陰性細胞であり、AILIM陽性細胞のほとんどがT細胞である。健常人末梢血由来には、僅かではあるがB細胞においてもAILIMを発現が認められる。

(V) 関節リウマチ（RA）患者の関節腔液中の関節組織浸潤T細胞（CD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞）においては、同患者の末梢血中のT細胞及び健常人の末梢血中のT細胞のいずれに比べても、有意に高いAILIMの発現が認められる。

(VI) 変形性関節症（OA）患者の関節腔液中のCD4陽性T細胞においても、AILIM陽性細胞の比率が有意に上昇している。また、進行性全身性硬化症（PSS）患者のCD4陽性T細胞においてもAILIM陽性細胞の比率が有意に上昇している。

(VII) マウスリンパ組織由来のT細胞においては、抗CD3抗体、コンカナバリンA (*Concanavalin A*; ConA)、またはPMA (*phorbol myristate acetate*) とIonophoreで刺激すると約3乃至6時間後にAILIMの発現の上昇が認められ、刺激後約12時間で最大のAILIMの発現が認められる。刺激から約24時間以降においてもAILIMの高い発現が認められ、その発現は、約48時間後でも同程度の発現が維持される。

- 1 1 -

(VIII) ヒト末梢血 T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞) を PMA 及び Ionophore で活性化すると、刺激後約 8 時間後に AILIM の高い発現が認められる。また、ヒト末梢血 T 細胞においては、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体、または抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体のいずれの刺激によっても AILIM の高い発現が誘導される。

(IX) AILIM は、Th2 タイプのサイトカイン産生の性状を有する株化 T 細胞 (D 10, MS202, CD28K0, EL-4 など) でコンスティテューティブ (constitutive) な発現が認められる。また、それらの細胞株での AILIM の発現は、CD28 の発現と同等またはそれ以上に高い発現である。

(X) 正常マウス及びラットの脾臓または胸腺由来の T 細胞または健常人の末梢血由来の T 細胞を、本発明を構成する抗 AILIM 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該 T 細胞からのサイトカイン (IFN  $\gamma$ 、IL-4、TNF  $\alpha$ 、IL-2、IL-10) の産生及び T 細胞の増殖が誘導される。

(XI) ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、本発明を構成する抗 AILIM 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該 T 細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進される。また、この結果は、ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、抗 CD28 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等である。

(XII) 正常脾臓及び胸腺の各々から単離した胸腺細胞及び脾臓細胞 (各々粘着性細胞を除去) を抗 CD3 抗体をコーティングしたプレート中で培養することにより T 細胞反応を惹起した T 細胞に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を添加すると、該 T 細胞からのサイトカイン (例えば、インターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン 4 (IL-4) など) の産生が抑制されるとともに、該 T 細胞の増殖が抑制される。また、該抗 AILIM 抗体による T 細胞反応 (前記サイトカイン産生、細胞増殖など) の抑制は、抗体の濃度に依存するものである。一方、抗 AILIM 抗

- 1 2 -

体の代わりに抗 CD28 抗体を加える場合には、抗 AILIM 抗体を用いた場合の結果は逆に該 T 細胞反応が増強される。

(XIII) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及び LPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導した肝炎モデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与すると、抗体濃度依存的に血中の IFN- $\gamma$  の上昇が有意に抑制されるとともに、GOT/GPT の上昇が有意に抑制される。

(XIV) 結核死菌を投与することによる誘導した関節炎モデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与すると、抗体濃度依存的に足腫れが有意に抑制されるとともに、関節炎の種々のパラメーターの上昇が有意に抑制される。

(XV) 移植片対宿主病 (*graft versus host disease*; GVHD) のモデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与すると、移植片対宿主反応 (GVH reaction) の産物である IgG 及び IgE の産生が有意に抑制されるとともに、自己抗体価の指標である抗 dsDNA 抗体の産生の上昇が有意に抑制される。

(XVI) 外来抗原としてのヒツジ赤血球 (*sheep red blood cell*; SRBC) を感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与 (感作直後または数日後) すると、外来抗原である該 SRBC に対する抗体の産生の上昇が有意に抑制される。また、その抑制効果は、CTLA4-Ig を投与した場合の抑制効果よりも高いものである。

(XVII) 外来抗原としての NP-KLH を感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与 (感作直後または数日後) すると、外来抗原である該 NP-KH に対する抗体の産生の上昇が有意に抑制される。

(XVIII) 抗 AILIM 抗体が、異なる健常人ドナー由来の末梢血単核球 (PBMC) と T 細胞とのアロジェニック混合リンパ球反応 (MLR) における T 細胞の細胞増殖を有意に抑制する。

- 13 -

本発明の医薬組成物は、AILIMを発現する細胞へのAILIMを介するコストイミュレイトリーシグナル（副刺激シグナル）の伝達が関与する種々の生体反応（例えば、AILIMを発現する細胞の細胞増殖、AILIMを発現する細胞によるサイトカインの産生、AILIMを発現する細胞の免疫細胞溶解（immune cytotoxicity）若しくは細胞死（apoptosis）、及びAILIMを発現する細胞に対する抗体依存性細胞障害を誘導する活性など）を制御するための医薬品として、及び／または該AILIMを介するシグナル伝達に関与する種々の疾患の発症及び／または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

具体的には、本発明の医薬組成物は、AILIM発現細胞の増殖の制御（抑制または促進）またはAILIM発現細胞によるサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン4など）の産生を制御（抑制または促進）することが可能であり、AILIMを介するシグナル伝達に関与する様々な生理現象により惹起される種々の病的状態の抑制、及び種々の疾患の治療または予防を可能にする。

本発明の医薬組成物を用いることにより、例えば、関節症（例えば、関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）、変形性関節症（osteoarthritis; OA））、炎症（例えば、肝炎）、移植片対宿主反応（graft versus host reaction; GVH reaction）、移植片対宿主病（graft versus host disease; GVHD）、組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原若しくは自己抗原により惹起される免疫反応（例えば、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、サイトカインの産生など）を抑制、予防及び／または治療することが可能である。

また、本発明の医薬組成物は、抗炎症薬としての種々のステロイド剤が適用されているような任意の炎症の治療または予防に適用することが可能である。

本発明の医薬組成物の適用が可能な炎症性疾患としては、例えば、種々の関節炎（関節リウマチ、変形性関節症など）に伴う炎症、肺炎、肝炎（ウイルス性の肝炎を含む）、感染症に伴う炎症、炎症性腸疾患、腸炎、腎炎（糸球体腎炎、腎線維症に伴う炎症）、胃炎、血管炎、膵炎、腹膜炎、気管支炎、心筋炎、脳炎、

- 14 -

虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、組織や臓器の移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、種々の皮膚の炎症（乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬など）、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症、自己免疫性甲状腺炎などが挙げられる。

即ち、本発明は、下記(1)乃至(32)に記載されるとおりの発明である。

(1) AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(2) 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(1)に記載の医薬組成物。

(3) 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載の医薬組成物。

(4) 該関節症が、関節リウマチであることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(5) 該関節症が、変形性関節症であることを特徴とする前記(1)乃至前記(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(6)に記載の医薬組成物：

- a) AILIM に結合する抗体またはその一部；
- b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；

- 15 -

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド ; 及び

d) AILIM に結合するポリペプチド。

(8) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 該非蛋白性物質が、DNA、RNA または化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(8)に記載の医薬組成物。

(10) AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(11) 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(10)に記載の医薬組成物。

(12) 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする前記(11)に記載の医薬組成物。

(13) 該炎症が、肝炎であることを特徴とする前記(10)乃至前記(12)のいずれかに記載の医薬組成物。

(14) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(10)乃至前記(13)のいずれかに記載の医薬組成物。

(15) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(14)に記載の医薬組成物 :

a) AILIM に結合する抗体またはその一部 ;

b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド ;

- 1 6 -

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド ; 及び

d) AILIM に結合するポリペプチド。

(16) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(10)乃至前記(13)のいずれかに記載の医薬組成物。

(17) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(16)に記載の医薬組成物。

(18) AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(19) 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(18)に記載の医薬組成物。

(20) 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする前記(19)に記載の医薬組成物。

(21) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(18)乃至前記(20)のいずれかに記載の医薬組成物。

(22) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(21)に記載の医薬組成物 :

a) AILIM に結合する抗体またはその一部 ;

b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド ;

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド ; 及び



- 17 -

d) AILIM に結合するポリペプチド。

(23) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(18)乃至前記(20)のいずれかに記載の医薬組成物。

(24) 該非蛋白性物質が、DNA、RNA または化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(23)に記載の医薬組成物。

(25) AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、外来抗原または自己抗原により惹起される免疫反応を抑制するための医薬組成物。

(26) 該免疫反応が、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、またはサイトカインの産生であることを特徴とする前記(25)に記載の医薬組成物。

(27) 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(25)または前記(26)に記載の医薬組成物。

(28) 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする前記(27)に記載の医薬組成物。

(29) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の医薬組成物。

(30) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(29)に記載の医薬組成物：

a) AILIM に結合する抗体またはその一部；

b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び

d) AILIM に結合するポリペプチド。

(31) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の医薬組成物。

(32) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(31)に記載の医薬組成物。

以下、本発明で用いられる抗体の一般的製造方法、並びに本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトである。

本発明における「AILIM」とは、「activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule」の略称である。このAILIMは、最近本発明者らが同定、単離し、日本国特許出願公開平 11-29599 号公報（平成 10 年特許出願第 62217 号）及び対応する国際特許出願公開 W098/38216 号公報（国際特許出願番号 PCT/JP98/00837）中において報告した「JTT-1 抗原」または「JTT-2 抗原」と命名した哺乳動物由来の新規細胞膜表面分子を意味する。

具体的には、上記特許出願公開公報において、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を有するヒト AILIM（ヒト JTT-1 抗原）、配列番号 4 または配列番号 6 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を有するラット AILIM（ラット JTT-1 抗原）並びに配列番号 5 に記載されるアミノ酸配列を有するマウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）を意味する。

ヒト AILIM と全く同一のヒト由来分子について、クロチェク（KroczeK）らのグループが、本発明者らによる前記 2 つの特許出願の公開公報の公開日より後に公開された 2 つの文献中で報告している。彼らはそのヒト由来分子を、ICOS (inducible co-stimulator) または 8F4 と命名している（国際特許出願公開 W099/15553 号公報、及び Nature, Vol.397, p.263-266, 1999）。当該 ICOS または 8F4

と命名されたヒト由来の分子もヒト AILIM と同一分子として本願に取り入れられる。

また、本発明で言う「AILIM」には、該既報の文献中に記載された各々の哺乳動物の AILIM のアミノ酸配列、特に好ましくはヒト AILIM のアミノ酸配列（日本国特許出願公開平 11-29599 号公報及び対応する国際特許出願公開 W098/38216 号公報に記載される配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列）と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、該既報のアミノ酸配列を含むポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本願発明の「AILIM」の範囲に包含されることを意味する。

そのようなアミノ酸の置換、欠失、または挿入は常法に従って行うことができる（実験医学別冊・「遺伝子工学ハンドブック」（1992）など）。

例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法（gapped duplex）法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131 酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNA セグメント合成法などを挙げることができる。

合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入（gapped duplex）法は、例えば下記のように行うことができる。アンバー変異をもつ M13 ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージ DNA を調製する。アンバー変異をもたない M13 ベクターの RFIDNA を制限酵素処理により線状とし、上記

- 20 -

の一本鎖ファージ DNA と混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼの反応により閉環状 2 本鎖 DNA とする。この DNA をミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌 mutS 株にトランスフェクションし、増殖したファージをサプレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。

また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、例えば下記のような原理を利用する。DNA を亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンヒポキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化された DNA を細胞に導入すると、DNA 複製時にヒポキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖 DNA 断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

本発明における「マイトジェン」とは、分裂促進剤とも呼ばれ、細胞分裂を誘起する物質を指す。免疫学的には、抗原非特異的 (ポリクローナル) にリンパ球を幼弱化し分裂を誘起させるものを意味する。例えば、PHA や PWM などのレクチン、コンカナバリン A (Concanavalin A; ConA)、リボ多糖、ストレプトリシン S、抗リンパ球抗体などが挙げられる。コンカナバリン A や PHA は、T リンパ球のみに作用し、リボ多糖は B リンパ球のみに作用し、PWM は両リンパ球に作用することが知られている。

本願明細書中で用いられる「リンパ芽球細胞」なる用語は、大リンパ球、リンホブラスト (lymphoblast) あるいは免疫芽細胞とも呼ばれ、リンパ性組織 (リンパ節、脾臓、胸腺、骨髓、リンパ管、扁桃腺など) や血液中に存在するリンパ球の内の大リンパ球に属するリンパ球を指す。

- 2 1 -

本願明細書中で用いられる「活性化リンパ球」なる用語は、例えば下記のようなリンパ球を意味するがこの限りではない。例えば、何らかの刺激により活性化されたリンパ球を指す。リンパ球は、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細胞に分類され、さらにT細胞についてはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分類することができる。従って、本発明で言う「活性化リンパ球」には、主に活性化T細胞、活性化B細胞、および活性化ナチュラルキラー細胞が含まれ、さらに活性化T細胞には活性化CD4陽性細胞と活性化CD8陽性細胞が含まれる。

CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカイン（IFN $\gamma$ 、IL-4など）を分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖して活性化される。活性化CD4陽性T細胞とは、このような状態のCD4陽性T細胞を指す。

CD8陽性T細胞は、抗原に反応するとIL-2Rを発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害性をもつCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すようになる。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒の中にはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成されるMACによく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン（proteoglycan）なども含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN $\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。活性化CD8陽性T細胞とは、このような状態のCD8陽性T細胞を指す。

T細胞は汎血球凝集素（植物凝集素、PHA）やコンカナバリンA（Con A）に反応して芽球化現象を示すが、このような状態のT細胞も活性化T細胞に含まれる。

B細胞では、B7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リンフォカインを産生したりし、

- 22 -

刺激を受けて細胞が大きくなったり、増殖を起こすなどの変化が見られる。活性化 B 細胞とは、このような状態の B 細胞を指し、本発明においては、抗体を分泌するようになった B 細胞（抗体分泌細胞(antibody-secreting cell)及び形質細胞(plasma cell)）も活性化 B 細胞に含まれる。

活性化ナチュラルキラー細胞とは、前述のとおり腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害作用を示すナチュラルキラー細胞を指す。なお、本発明においては、コンカナバリン A (Con A) で刺激された胸腺細胞も活性化リンパ球に含まれる。

本発明において用いられる「活性化リンパ芽球細胞」には、前記のような「リンパ芽球」が、コンカナバリン A のような前記「マイトジェン」で刺激を受けて活性化されたリンパ芽球が含まれる。

本願明細書で場合によって用いられる「静止期リンパ球」なる用語は、前述の活性化リンパ球と対照的に、細胞の活性化のための刺激を受けていない非活性化状態のリンパ球を指す。

本発明を構成する「AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生」における「サイトカイン」とは、AILIM を発現する細胞（特に、T 細胞）が産生する任意のサイトカインを意味する。

該 T 細胞は、Th1 タイプの T 細胞及び Th2 タイプの T 細胞が挙げられ、本発明における該サイトカインは、特にそれら Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカイン及び／または Th2 タイプの T 細胞が産生する任意のサイトカインを意味する。

Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF、IL-3 などが挙げられ、また Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインとしては、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10、TNF などが挙げられる（細胞、Vol.30, No.9, p.34 3-346, 1998）。

本発明を構成する「物質」、具体的には「AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物

- 23 -

質」には、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。

ここで、「AILIMを介するシグナル伝達」とは、上述または後述する実施例で詳述するようなAILIMを発現する細胞に任意の表現型の変化（細胞増殖、細胞の活性化、細胞の不活性化、細胞死、及び／またはAILIM発現細胞からの任意のサイトカインの産生能の変化）をもたらすようなAILIMを通じたシグナル伝達を意味する。

該「物質」は、「蛋白性物質」と「非蛋白性物質」に大別することができる。

該「蛋白性物質」としては、後述するポリペプチド、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部）が挙げられる。

該物質が抗体である場合には、好ましくはモノクローナル抗体である。該物質がモノクローナル抗体である場合には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、後述する組換えキメラモノクローナル抗体、組換えヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が包含される。

該物質が、ポリペプチドである場合には、後述するポリペプチド、該ポリペプチドの断片（オリゴペプチド）、融合ポリペプチド、及びそれらいずれかの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

該ポリペプチドの具体例としては、後述する下記が挙げられる。

- (1)AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- (2)AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；または、
- (3)AILIMに結合するポリペプチド。

- 24 -

該「非蛋白性物質」としては、DNA、RNA及び化学的に合成された化合物が挙げられる。

ここで、「DNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするDNA（cDNA及びゲノミックDNAを含む）の塩基配列を基に設計されるアンチセンスDNA医薬として有用な「該DNAの部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」を意味する。即ち、該アンチセンスDNAは、AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、該DNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び／または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホチオエート結合、ホスホジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修



- 25 -

飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

ここで、「RNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするRNAの塩基配列を基に設計されるアンチセンスRNA医薬として有用な「該RNAの部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」を意味する。該アンチセンスRNAは、AILIMをコードするDNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

該アンチセンスRNAは、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンスDNAに適用されるような化学修飾を挙げることができる。

「化学的に合成された化合物」とは、上述のDNA、RNA及び蛋白性物質を除く任意の化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」とは、AILIM（好ましくはヒトのAILIM）を構成するポリペプチド鎖の一部（断片）を意味し、好ましくはAILIMを構成するポリペプチドの細胞外領域の全部またはその一部を意味する

- 26 -

(該領域は所望応じそのN末端及び／またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。 ) 。

本発明に係るAILIMは、1または2のポリペプチド鎖により構成される細胞膜を貫通する細胞膜貫通分子である。

ここで「細胞膜貫通蛋白」とは、多くの受容体あるいは細胞膜表面分子に見られるように、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとる蛋白を指す。さらにそのような膜貫通性蛋白は、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(oligomer)を形成して存在することにより、各々の受容体や細胞表面分子を構成する。

ここで「細胞外領域」とは、前述のような細胞膜膜貫通蛋白の全体構造のうち、該膜蛋白が連結している膜の外界側に存在する部分構造(部分領域)の全部または一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域(膜貫通領域)及び該膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域(細胞内領域)以外の領域の全部または一部を意味する。

前述の「蛋白性物質」に包含される「融合ポリペプチド」とは、AILIM(好ましくはヒトのAILIM)を構成するポリペプチドの細胞外領域の全部または一部と「免疫グロブリン(Ig、好ましくはヒトのIg)の重鎖の定常領域の全部または一部」とからなる融合ポリペプチドである。好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる領域(Fc)との融合ポリペプチドである。なお、IgGとしては、

- 27 -

IgG1 が好ましい。また、AILIM としては、ヒト、マウスまたはラット（好ましくはヒト）の AILIM が好ましい。

ここで「免疫グロブリン（Ig）の重鎖の定常領域の全部または一部」とは、好ましくはヒト由来の免疫グロブリンの重鎖（Heavy Chain, H鎖）の定常領域（Constant region）、Fc 領域またはそれらの一部を意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG（IgG1、IgG2、IgG3 及び IgG4）、IgM、IgA（IgA1 及び IgA2）、IgD 及び IgE を挙げることができる。好ましくは、IgG（IgG1、IgG2、IgG3 若しくは IgG4）、または IgM である。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来の IgG（IgG1、IgG2、IgG3 若しくは IgG4）に属する免疫グロブリンである。

免疫グロブリンは、2つの相同な軽鎖（Light Chain, L鎖）と2つの相同な重鎖（Heavy Chain, H鎖）の4つの鎖が、ジスルフィド結合（S-S結合）で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）及び軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）から構成される。重鎖は、重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）と重鎖定常領域（C<sub>H</sub>）から構成される。

重鎖定常領域は、クラス（IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE）並びにサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。

IgG（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインから構成される。

同様にIgG1の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C $\gamma_1$ 1ドメイン、ヒンジ領域、C $\gamma_1$ 2ドメイン及びC $\gamma_1$ 3ドメインから構成される。IgG2の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C $\gamma_2$ 1ドメイン、ヒンジ領域、C $\gamma_2$ 2ドメイン及びC $\gamma_2$ 3ドメインから構成される。IgG3の重鎖は、N末端から順に、V<sub>H</sub>、C $\gamma$

- 28 -

$\gamma_3$  1 ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_3$  2 ドメイン及び  $C\gamma_3$  3 ドメインから構成される。IgG 4 の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_4$  1 ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_4$  2 ドメイン及び  $C\gamma_4$  3 ドメインから構成される。

IgA の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha$  1 ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha$  2 ドメイン及び  $C\alpha$  3 ドメインから構成される。

同様に IgA 1 の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha_1$  1 ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_1$  2 ドメイン及び  $C\alpha_1$  3 ドメインから構成される。IgA 2 の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha_2$  1 ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_2$  2 ドメイン及び  $C\alpha_2$  3 ドメインから構成される。

IgD の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\delta$  1 ドメイン、ヒンジ領域、 $C\delta$  2 ドメイン及び  $C\delta$  3 ドメインから構成される。

IgM の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\mu$  1 ドメイン、 $C\mu$  2 ドメイン、 $C\mu$  3 ドメイン及び  $C\mu$  4 ドメインから構成され、IgG、IgA 及び IgD に見られるようなヒンジ領域を有しない。

IgE の重鎖は、N 末端から順に、 $V_H$ 、 $C\epsilon$  1 ドメイン、 $C\epsilon$  2 ドメイン、 $C\epsilon$  3 ドメイン及び  $C\epsilon$  4 ドメインから構成され、IgG、IgA 及び IgD に見られるようなヒンジ領域を有しない。

さらに、IgG を例に挙げるならば、IgG をパパインで処理すると、2 つの重鎖を連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のやや N 末端側で切断されて、 $V_H$  及び  $C_H$  1 からなる重鎖断片と 1 つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した 2 つの相同な Fab、並びにヒンジ領域、 $C_H$  2 ドメイン及び  $C_H$  3 ドメインからなる 2 つの相同な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した 1 つの Fc を生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第 2 版、第 65～75 頁、1992 年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第 4～7 頁、1991 年、南江堂発行など参照）。

即ち、上述の「免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の定常領域一部を意味し、好ましくは、C1ドメインを欠く定常領域またはFc領域である。具体的には、IgG、IgAまたはIgDの場合には、各々のヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなる領域が挙げられ、IgMまたはIgEの場合には、各々のC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のIgG1のFc領域を挙げることができる。

上述の融合ポリペプチドは、前述のようなIgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部（例えば、Fc）を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティークラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」には、また「AILIMに結合するポリペプチド」が包含される。

「AILIMに結合するポリペプチド」としては、具体的には、AILIMと相互作用するリガンドである既知のB7h、B7RP-1、GL50あるいはLICOSと称される分子（Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000）を構成するポリペプチドの全部または一部を含むポリペプチドが挙げられる。

好ましくは、上記リガンド（B7h、B7RP-1、GL50、LICOS）の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド、または該ポリペプチドと免疫グロブリン（好ましくはヒト免疫グロブリン）の重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合

- 30 -

ポリペプチドである。ここで、「細胞外領域」及び「免疫グロブリンの重鎖の定常領域」なる用語については、上述と同様の意味を有する。

上述したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断片）及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明における「抗体」とは、前記で定義した哺乳動物の AILIM（特に好ましくはヒト AILIM）に対するポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、AILIM に結合し AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM に結合し AILIM 発現細胞によるインターフェロン $\gamma$ 若しくはインターロイキン 4 の産生を抑制する活性を有する抗体である。

本発明の「抗体」は、本発明の AILIM を発現する細胞（天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など）、AILIM をその細胞表面に高発現するように遺伝子組換え技術を用いて作製された形質転換体、AILIM を構成するポリペプチド、該 AILIM ポリペプチド、または AILIM の細胞外領域を含む前述の融合ポリペプチドを抗原として用い、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted 抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

モノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgD あるいは IgE 等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体もが包含される。好ましくは、IgG または IgM である。

ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動

- 3 1 -

物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー（Nature）、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラ

- 3 2 -

ット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-AG8.653 (653)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP 2/0-Ag14 (Sp2/0、Sp2)、PAI、F0 あるいは BW5147、ラット由来ミエローマ 210 RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマ U-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CE M-AGR、D1R11 あるいは CEM-T15 を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えば R I A や E L I S A 等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F12 培地、MCDB153 培地あるいは低カルシウム MEM 培地等の低カルシウム培地及び MCDB104 培地、MEM 培地、D-MEM 培地、RPM I1640 培地、ASF104 培地あるいは RD 培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、



- 33 -

該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティークラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

「組換えキメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

組換えキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>H</sub>遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したCH遺伝子（H鎖定常領

- 3 4 -

域をコードするC遺伝子)を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>L</sub>遺伝子(L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子)の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>L</sub>遺伝子(L鎖定常領域をコードするC遺伝子)を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素(例えばEcoRI、Hind III等)を用いて消化し、電気泳動に付して(例えば0.7%アガロースゲル使用)サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベッキング(75℃、3時間)を行う。ベッキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間(例えば、2×SSC/0.1%SDS溶液、室温、10分間)のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定した

DNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、 $\lambda$ EMBL3、 $\lambda$ EMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（ $\kappa$ ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンデビス法（Science、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列された $V_H$ (VDJ)遺伝子あるいは $V_L$ (VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒト $C_H$ 遺伝子及びヒト $C_L$ 遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、 $C_H$ 遺伝子である $C\gamma 1$ 遺伝子と $C_L$ 遺伝子である $C\kappa$ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒト $C\gamma 1$ 遺伝子及びヒト $C\kappa$ 遺伝子に相当するマウス $C\gamma 1$ 遺伝子及びマウス $C\kappa$ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には、例えば、クローンIg146（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第75巻、第4709～第4713頁、1978年）からの3kbのHind III-BamHI断片とクローンMEP10（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第78巻、第474～第478頁、1981年）からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのHae III-AluIゲノムライブラリー（Cell、第15巻、第1157～第1174頁、1978年）中から、ヒト $C\kappa$ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒト $C\gamma 1$ 遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHind IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドを入788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

- 36 -

このようにして単離されたマウス  $V_H$  遺伝子とマウス  $V_L$  遺伝子、及びヒト  $C_H$  遺伝子とヒト  $C_L$  遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウス  $V_H$  遺伝子の下流にヒト  $C_H$  遺伝子を、またマウス  $V_L$  遺伝子の下流にヒト  $C_L$  遺伝子を、適切な制限酵素及び DNA リガーゼを用いて、例えば pSV2gpt あるいは pSV2neo 等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス  $V_H$  遺伝子／ヒト  $C_H$  遺伝子とマウス  $V_L$  遺伝子／ヒト  $C_L$  遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えば P3X63・Ag 8・653 細胞あるいは SP210 細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted 抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である 3 つの領域 (Complementarity-determining residue ; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域と

は、該 3 つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された 4 つの領域 (Framework region ; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、I g G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、I g M、I g A、I g D 及び I g E 等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明においては、該ヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒト I g G の定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

ヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平 4-506458 号公報及び特開昭 62-296890 号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも 1 つのマウス H 鎖 CDR 遺伝子と該マウス H 鎖 CDR 遺伝子に対応する少なくとも 1 つのマウス L 鎖 CDR 遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウス H 鎖 CDR に対応するヒト H 鎖 CDR 以外の全領域をコードするヒト H 鎖遺伝子と、前マウス L 鎖 CDR に対応するヒト L 鎖 CDR 以外の全領域をコードするヒト L 鎖遺伝子を単離する。

単離した該マウス H 鎖 CDR 遺伝子と該ヒト H 鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウス L 鎖 CDR 遺伝子と該ヒト L 鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう 1 つの発現ベクターに導入する。または、該マウス H 鎖 CDR 遺伝子／ヒト H 鎖遺伝子とマウス L 鎖 CDR 遺伝子／ヒト L 鎖遺伝子を

- 38 -

同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体）は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994 ; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997 ; 特表平 4-504365 号公報 ; 特表平 7-509137 号公報 ; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年 ; 国際出願公開 W094/25585 号公報 ; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994 ; 及び特表平 6-500233 号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中からヒト由来タンパクを製造方法を適用することも可能である（日経サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、 $sFv$ 、 $dsFv$  (disulphide stabilized  $Fv$ ) あるいは  $dAb$  (single

domain antibody) などを意味する (Exp. Opin. Ther. Patents, 第6巻, 第5号, 第441~456頁, 1996年)。

ここで、「F(ab')<sub>2</sub>」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてV<sub>L</sub> (L鎖可変領域) とC<sub>L</sub> (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びV<sub>H</sub> (H鎖可変領域) とC<sub>H</sub>γ1 (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab' という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')<sub>2</sub> という。

本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される「物質」、具体的には「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質」並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物である。具体的には、前記で定義した「蛋白性物質」若しくは「非蛋白性物質」、並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。さらに具体的には、前記に定義したポリペプチド、該ポリペプチドの一部 (断片)、融合ポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体若しくは該モノクローナル抗体の一部のいずれかと薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記ポリペプチドや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき  $10\mu\text{g}$  から  $1000\text{mg}$ （あるいは  $10\mu\text{g}$  から  $500\text{mg}$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に  $0.1\mu\text{g}$  抗体/ $\text{ml}$  担体 $\sim 10\text{mg}$  抗体/ $\text{ml}$  担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において  $1\text{kg}$  体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$  の割合で、好ましくは  $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$  の割合で、1日あたり1回 $\sim$ 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。



- 4 1 -

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、膵炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、炎症性腸疾患、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、細菌やウイルスによる感染により惹起される種々の症状（例えば、炎症）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、種々の皮膚疾患（例えば、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、乾癬、強皮症）、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。

本発明における「炎症」には、急性炎症及び慢性炎症のいずれもが包含される。

一般に急性炎症とは、炎症反応が比較的急速に発現し進行が速く、その終了が明確な炎症である。一方、慢性炎症とは、炎症反応が比較的ゆっくりあるいは

徐々に発現し、あるいはその発現の存在すら不明確な程度に発現し、数週間乃至数年間にわたり持続され、その終了も不明確な炎症である。

また、本発明における炎症には、任意の組織で起こる炎症もが包含される。具体的には、脳、眼、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、胃、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻炎膜あるいは関節などの組織における炎症が含まれる。

本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、正常マウス胸腺由来 T 細胞における CD3、CD28 及び AILIM (ThA と別称する) の発現状態を示す図。

分図 (a) は CD3 及び AILIM (ThA と別称する) の発現状態を示す。分図 (b) は CD3 及び CD28 の発現状態を示す。

図 2 は、正常マウス胸腺由来 T 細胞での CD28 及び AILIM の発現状態を、CD4 及び CD8 の発現を指標とした T 細胞の分化の各段階毎に示す図。

R2 乃至 R8 は、各々下記を示す。

R2 : CD4 陰性 CD8 陰性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R3 : CD4 弱陽性 CD8 弱陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R4 : CD4 陽性 CD8 陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R5 : CD4 陽性 CD8 弱陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R6 : CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R7 : CD4 弱陽性 CD8 陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R8 : CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

図 3 は、正常マウス脾臓組織に含まれる CD4 陽性 T 細胞における AILIM の発現状態を示す図。

図 4 は、肝炎を罹患した宿主の肝臓組織浸潤 CD4 陽性 T 細胞における AILIM の発現状態を示す図。

図 5 は、関節リウマチ患者の末梢血中 T 細胞及び関節腔浸潤 T 細胞の各々に含まれる CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞の各々における AILIM 及び CD28 の発現状態を示す図。

図 6 は、種々の刺激剤で刺激して活性化した正常マウスのリンパ組織由来 T 細胞における、AILIM の発現状態を経時的に示す図。

図 7 は、マウスの各種 T 細胞株及び T 細胞由来ハイブリドーマでの AILIM の発現状態並びに他の種々の性状を概略的に示す図。

図 8 は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をコーティングしたプレートを用いて再現した CD3 と AILIM のクロスリンクによる、マウス脾臓由来 T 細胞の活性化能（IFN $\gamma$  の産生誘導能）を示す図。

図 9 は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をコーティングしたプレートを用いて再現した CD3 と AILIM のクロスリンクによる、ラット脾臓由来 T 細胞の活性化能（IFN $\gamma$  産生誘導能）を示す図。

図 10 は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をコーティングしたプレートを用いて再現した CD3 と AILIM のクロスリンクによる、ヒト末梢血由来 T 細胞の活性化能（IFN $\gamma$  産生誘導能）を示す図。

図 11 は、抗 CD3 抗体による刺激により活性化したヒト末梢血由来 T 細胞における、T 細胞反応の 1 つである IFN- $\gamma$  の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 12 は、抗 CD3 抗体による刺激により活性化したヒト末梢血由来 T 細胞における、T 細胞反応の 1 つである IL-4 の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

---

- 4 4 -

図 1 3 は、抗 CD3 抗体による刺激により活性化したマウス胸腺由来 T 細胞における、T 細胞反応の 1 つである IL-4 の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 4 は、抗 CD3 抗体による刺激により活性化したマウス脾臓由来 T 細胞における、T 細胞反応の 1 つである IL-4 の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 5 は、関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗 AILIM 抗体の複数回投与による治療効果を示す図。

図 1 6 は、肝炎宿主における病状悪化のパラメーターである IFN- $\gamma$  の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による治療効果を示す図。

図 1 7 は、肝炎宿主における病状悪化のパラメーターである GPT 及び GOT の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 8 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである IgG の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 9 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである IgE の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 2 0 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである抗 dsDNA 抗体価の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 2 1 は、外来抗原である SRBC で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の産生の抗 AILIM 抗体 (抗原感作直後に投与) による抑制効果を示す図。

図 2 2 は、外来抗原である SRBC で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の産生の抗 AILIM 抗体 (抗原感作 7 日目に投与) による抑制効果を示す図。

図 2 3 は、正常組織 (胸腺、リンパ節及び末梢血) 並びに病変部位での AILIM の発現状態、並びに CD28 の発現状態を模式的に示す図。

- 4 5 -

図 2 4 は、健常人末梢血由来 T 細胞及び該 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM、CD28、CD4、CD8、CD19、及び CTLA-4 の各々の発現状態を示す図。

分図(a)は、末梢血由来 T 細胞の種々細胞の分布を示す。

分図(b)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞の分布を示す。

分図(c)は、末梢血由来 T 細胞における CD4 及び CD8 の発現状態を示す。

分図(d)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における CD4 及び CD8 の発現状態を示す。

分図(e)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CD4 の発現状態を示す。

分図(f)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CD4 の発現状態を示す。

分図(g)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CD28 の発現状態を示す。

分図(h)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CD28 の発現状態を示す。

分図(i)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CTLA-4 の発現状態を示す。

分図(j)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CTLA-4 の発現状態を示す。

分図(k)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CD19 の発現状態を示す。

分図(l)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CD19 の発現状態を示す。

図 2 5 は、健常人末梢血に由来する T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、該各々の T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す図。

分図(a)は、末梢血 T 細胞及び該 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す。

分図(b)は、末梢血 CD4 陽性 T 細胞及び該 T 細胞から分離した CD4 陽性 AILIM 陽性 T 細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す。

分図(c)は、末梢血 CD8 陽性 T 細胞及び該 T 細胞から分離した CD8 陽性 AILIM 陽性 T 細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す。

図 26 は、慢性関節リウマチ (RA) 及び変性性関節炎 (OA) に罹患している患者の各々の末梢血由来 T 細胞及び関節腔液由来 T 細胞、並びに進行性全身性硬化症 (強皮症 ; PSS) 、及び全身性エリテマトーデス (SLE) に罹患している患者の各々の末梢血 T 細胞の各々における AILIM の発現状態を示す図。

図 27 は、アジュバント誘発関節炎モデルラットの胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血の各々に由来する T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞) における AILIM の発現状態を示す図。

図 28 は、各種の刺激で活性化させた健常人末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CTLA-4 の各々の発現状態を示す図。

分図(a)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した T 細胞における AILIM の発現の強さを示す。

分図(b)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した T 細胞における CTLA-4 の発現の強さを示す。

分図(c)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した CD4 陽性 T 細胞における AILIM の発現の強さを示す。

分図(d)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した CD4 陽性 T 細胞における CTLA-4 の発現の強さを示す。

分図(e)は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激または抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激で活性化した T 細胞における AILIM の発現の強さを示す。

分図(f)は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激または抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激で活性化した T 細胞における CTLA-4 の発現の強さを示す。

図 29 は、種々の抗体の刺激によるヒト末梢血 T 細胞における種々サイトカインの産生誘導能を示す図。

図 30 は、種々濃度の種々の抗体の刺激によるヒト末梢血 T 細胞の細胞増殖誘導能を示す図。

図 31 は、種々抗体の刺激によるヒト末梢血 T 細胞の経時的な細胞増殖誘導能を示す図。

図 32 は、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体をコーティングしたマイクロプレート中での培養におけるマウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞の各々の増殖の程度を示す図。

分図(a)は、マウス脾臓細胞の増殖の程度を示す。

分図(b)は、マウス脾臓由来 T 細胞の増殖の程度を示す。

図 33 は、抗 CD3 抗体（濃度一定）及び抗 AILIM 抗体（各種濃度）をコーティングしたマイクロビーズ（濃度一定）を用いた培養におけるマウス脾臓細胞の各々の増殖の程度を示す図。

図 34 は、抗 CD3 抗体（濃度一定）及び抗 AILIM 抗体（濃度一定）をコーティングしたマイクロビーズ（種々濃度）を用いた培養におけるマウス脾臓細胞の増殖の程度を示す図。

図 35 は、抗 CD3 抗体（濃度一定）及び抗 AILIM 抗体（濃度一定）をコーティングしたマイクロビーズ（種々濃度）を用いた培養におけるマウス脾臓由来 T 細胞の増殖の程度を示す図。

図 36 は、種々濃度の種々の抗体の刺激によるラットリンパ節由来 T 細胞の細胞増殖誘導能を示す図。

図 37 は、関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗 AILIM 抗体の単回投与（濃度一定）による治療効果を示す図。

図 38 は、関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗 AILIM 抗体の単回投与（種々濃度）による治療効果を示す図。

図39は、移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つであるIgGの産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図40は、移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つであるIgEの産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図41は、移植片対宿主病（GVHD）の移植変対宿主反応（GVH反応）の1つである抗dsDNA抗体価の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図42は、外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG1抗体の産生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図43は、外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgM抗体の産生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図44は、外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG1抗体の産生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図45は、外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG2b抗体の産生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図46は、外来抗原であるNP-KLHで免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対するIgG2a抗体の産生の抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図47は、健常人「ドナーA」のT細胞を健常人「ドナーD」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。



- 49 -

図48は、健常人「ドナーD」のT細胞を健常人「ドナーB」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

図49は、健常人「ドナーC」のT細胞を健常人「ドナーA」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗CD80抗体と抗CD86抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒトCD34/IgG1マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒトCTLA4-IgFcキメラ分子。

「SA12」：抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体。

図50は、健常人「ドナーE」のT細胞を健常人「ドナーG」のPBMCと培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該T細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該T細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

- 50 -

「control mIgG」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

図 5 1 は、健常人「ドナー F」の T 細胞を健常人「ドナー E」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての  $[^3\text{H}]$  チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「control mIgG」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

図 5 2 は、健常人「ドナー G」の T 細胞を健常人「ドナー F」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての  $[^3\text{H}]$  チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「control mIgG」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

#### 実施例 1 実験材料の準備

以下に述べる試験で用いた実験材料（動物、抗体、細胞）は特に断りのない限り以下のようにして調製した。

##### <1-1> 動物

C57BL/6 マウス（雄、5 乃至 8 週齢）及び BALB/c マウス（雄、5 乃至 8 週齢）は、日本 SLC（株）より購入した。Wistar ラット（雄、5 乃至 6 週齢）は、日本チャールズリバー（株）より購入した。

##### <1-2> 抗ラット AILIM モノクローナル抗体の調製

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ラット AILIM モノクローナル抗体（マウス抗ラット JTT-1 抗原モノクローナル抗体）を産生する「JTT-1」及び「JTT-2」と各々命名したハイブリドーマ（2つのハイブリドーマは1996年10月11日付でブダペスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に国際寄託されている。<JTT-1>国際寄託番号 FERM BP-5707、及び<JTT-2>国際寄託番号 FERM BP-5708）を *in vitro* または *in vivo* で培養して得られる培養上清または腹水から精製したモノクローナル抗体を以下の試験で用いた（日本国特許出願公開11-29599号公報（実施例1及び2）、及び国際特許出願公開W098/38216号（実施例1及び2））。

以下、これらのマウス抗ラット AILIM モノクローナル抗体を、各々「JTT-1 抗体」及び「JTT-2 抗体」（IgG1）と呼ぶ。なお、「JTT-1 抗体」及び「JTT-2 抗体」は、各々「JMab49」及び「JMab50」とも別称する。

なお、以下の試験で用いられる抗ラット AILIM 抗体は特に断りのなりかぎり

「JTT-2 抗体」（JMab50 と別称 ; IgG1）である。

##### <1-3> 抗ヒト AILIM モノクローナル抗体の調製

- 5 2 -

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ヒト AILIM モノクローナル抗体（マウス抗ヒト JTT-1 抗原モノクローナル抗体）を産生する各々「SA12」及び「SG430」と命名したハイブリドーマ（各々 $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス）を、ICR nu/nu マウス（雌、7乃至8週齢）の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から各々のマウス抗ヒト AILIM モノクローナル抗体を大量調製した（日本国特許出願公開 11-29599 号公報（実施例 12）、及び国際特許出願公開 W098/38216 号（実施例 12））。

以下、これら 2 種類のマウス抗ヒト AILIM モノクローナル抗体の各々を「SA12 抗体」（IgG1）及び「SG430 抗体」（IgG1）と呼び、以下の試験で用いた

#### <1-4> 抗マウス AILIM モノクローナル抗体の調製

以下のようにして調製した。

以前本発明者らがクローニングしたマウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）（日本国特許出願公開 11-29599 号公報（配列番号 5）、及び国際特許出願公開 W098/38216 号（配列番号 5））の全長アミノ酸配列をコードする cDNA を用いて、遺伝子組換え技術を用いて常法に従ってマウス AILIM を発現する形質転換細胞を調製した。

該形質転換細胞をホモジナイズし、超遠心分離（ $100,000 \times g$ ）して、細胞膜画分を含む遠心残さを回収し、PBS に懸濁させた。得られた細胞膜画分を、完全フロインドアジュバントとともに Wistar ラットのフットパッド内に注射することにより初回免疫（0 日）した。さらに該細胞膜画分抗原を 7 日目、14 日目および 28 日目という間隔でフットパッド内に投与した。最後の免疫から 2 日後にリンパ節細胞を採取した。

該リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞 PAI（JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982）とを 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール 4000（Boehringer Mannheim 製）を用いて細胞融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、1

- 53 -

0%ウシ胎児血清とアミノプテリンを含有する HAT 含有 ASF104 培地（味の素製）中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体のマウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）に対する反応性を、各々の培養上清を、前記組換えマウス AILIM 発現形質転換細胞に反応させた後、FITC 標識抗ラット IgG（Cappel 製）と反応させることにより染色された細胞の蛍光強度を EPICS-ELITE フローサトメーターで測定することにより確認した。この結果、マウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを得た。

それらのハイブリドーマの内の 2 つを各々「B10.5」及び「B9B6」と命名した。これらのハイブリドーマの各々（各々 $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス）を、ICR nu/nu マウス（雌、7乃至8週齢）の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から各々のラット抗マウス AILIM モノクローナル抗体を大量調製した。以下、これらのハイブリドーマ「B10.5」及び「B9B6」の各々が産生するラット抗マウス AILIM モノクローナル抗体を「B10.5 抗体」（IgG2a）及び「B9B6 抗体」（IgG2a）と呼び、以下の試験で用いた。

#### <1-5> リンパ球の調製

マウスを断頭致死させた後、常法に従って胸腺及び末梢リンパ組織（脾臓、リンパ節）を各々採取し、ステンレス製メッシュ上で細切した。得られた細切組織を 10%FCS（ウシ胎児血清）を含有する RPMI1640 培地に懸濁させ細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液（各々 $1 \times 10^7$ 乃至 $3 \times 10^7$ /ml）をシャーレに播種し CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間培養した。培養後、シャーレから注意深く非粘着性細胞を回収し、RPMI1640 培地で洗浄し各種組織構成細胞を取得した。

ラットの胸腺及び末梢リンパ組織（脾臓、リンパ節）の各種組織構成細胞も、前記と同様にして取得した。

- 54 -

ヒト（健常人及び患者）の末梢血 T 細胞は、常法に従い、健常人及び患者の各々から採取したヘパリン採血液をリンホプレップ（Nycomed 製）で分離して末梢血単核球を取得した後、Pan T cell アイソレーションキット（ミルテニ製）を用いて回収した。

#### <1-6> 株化 T 細胞の調製

本発明者らが樹立した各種マウス T 細胞株（D10、MS202、CD28K0、EL-4、2L2、BC3C13）及びマウス T 細胞由来ハイブリドーマ BW5147 に由来する種々マウス T 細胞由来ハイブリドーマ（KV24、D0.11.10、8-4-31、3H10-11、61-21-25、1-2-66、6-13-64）を以下の試験において用いた。

#### 実施例 2 各種組織構成細胞及び各種細胞株での AILIM の発現の解析

動物（マウス、ラットまたはヒト）の正常組織及び病変組織から得られる細胞での AILIM の発現状態の差違、未刺激 T 細胞及び刺激した T 細胞（活性化 T 細胞）での AILIM の発現状態の差違、並びに各種 T 細胞株での AILIM の発現状態の差違を常法に従って細胞染色及びフローサイトメトリー（flow cytometry）によって解析した。

下記試験で得られた結果を基に、AILIM の組織及び細胞での発現パターンを、CD28 の発現のパターンと比較しながら、模式的に示した（図 23）。但し、当該模式図は、単なる例示であり下記試験で得られたデータを限定的に解釈するために用いられるものではないことは言うまでもない。

#### <2-1> 細胞染色及びフローサイトメトリー（flow cytometry）

細胞染色及びフローサイトメーター（flow cytometer）による解析は特に断りの無い限り下記のようにして行った。

上記のように取得した各種の組織構成細胞、刺激物質（抗 CD3 抗体、ConA、または PMA と ionophore など）で刺激若しくは未刺激の T 細胞、または各種 T 細胞株を、0.5% ウシ血清アルブミン（BSA）及び 5mM の EDTA を含有するリン酸緩衝

- 5 5 -

液 ( $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  を含まない。PBS-) に再分散させた後、下記 (A) または (B) の一次抗体を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させた。

(A) 前記の各種 AILIM 抗体 (抗マウス AILIM 抗体、抗ラット AILIM 抗体、抗ヒト AILIM 抗体) を FITC または PE (ピコエリスリン) で標識した標識抗体。

(B) 未標識の前記の各種 AILIM 抗体 (抗マウス AILIM 抗体、抗ラット AILIM 抗体、抗ヒト AILIM 抗体)。

次いで、細胞を前記リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後、同緩衝液に再分散させた。

なお、一次抗体として未標識の抗 AILIM 抗体 (前記 (B)) を用いた場合には、さらに FITC、PE またはビオチン (Biotin) で標識した抗マウス Ig 抗体または抗ラット Ig 抗体を二次抗体として細胞分散液に加え、上記と同様にして反応させた。

また、二次抗体としてビオチン標識抗体を用いた場合には、PE 標識したストレプトアビジン (Streptavidine; ファーミンジェン製) を細胞分散液に加え同様にして反応させた後、上記リン酸緩衝液に再分散させた。

上記染色により染色された細胞の大きさ及び蛍光強度を FACSsort (Becton Dickinson 製) を用いて測定し、AILIM の発現分布を LysisII 解析ソフトを用いて解析した。

#### <2-2> マウス胸腺組織由来 T 細胞における AILIM の発現の解析

前記<2-1>の方法によりマウスの正常リンパ組織である胸腺から単離した T 細胞における AILIM の発現を解析した。また同時に AILIM の発現様式の、他の分子 (T 細胞への一次シグナル伝達を担う CD3 分子、副刺激シグナル伝達を担う CD28 分子、T 細胞表面マーカーである CD4 及び CD8) の発現との相関性についても同様にして解析した。

結果を、図 1 及び図 2 に示す。この結果下記新たな知見が得られた。

まず、CD3 分子と AILIM 分子との発現の相関性については、AILIM の発現は CD3 の発現が高い細胞で同様に高い発現が認められ、両分子の発現が相関していた

(図 1(a))。一方、前者とは対照的に、コストイミュレイトリー分子である CD28 の発現は CD3 の発現が高い程その発現が低下していた (図 1(b))。これらの結果から、少なくとも正常胸腺 T 細胞においては、AILIM 及び CD28 の発現様式は、CD3 の発現との相関性の点で比較した場合、互いに相反するものであった。

胸腺 T 細胞の分化及び成熟の段階は、概ね次のとおりのステップを経る。

(1) CD4 陰性 CD8 陰性細胞 (図 2 の R2) から両分子の発現が僅かに認められる CD4 弱陽性 CD8 弱陽性細胞 (図 2 の R3) へ移行。

(2) CD4 弱陽性 CD8 弱陽性細胞 (図 2 の R3) から両分子を完全に発現する CD4 陽性 CD8 陽性細胞 (図 2 の R4) へと分化。

(3) ポジティブセレクションにより CD4 または CD8 いずれか一方の分子の発現が減弱していき (図 2 の R5 または R7)、最終的な CD4 陽性 CD8 陰性 (図 2 の R6) または CD4 陰性 CD8 陽性 (図 2 の R8) への分化、及び成熟の完了。

CD4 陰性 CD8 陰性細胞においては、AILIM 及び CD28 とともに発現が見られず、CD4 弱陽性 CD8 弱陽性細胞になりともに僅かな発現が見られた。CD28 の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性細胞で最大となり、その後の分化。成熟に伴って発現が低下した。

一方、AILIM の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性細胞においても僅かしか認められないものの、その後の細胞の分化、即ち、CD4 または CD8 の発現量の低下に伴い増加し、リンパ球のポジティブセレクションが達成される SP 細胞 (CD4 陽性 CD8 陰性細胞または CD4 陰性 CD8 陽性細胞) へ最終分化した時点で最大の発現が認められた。

この結果、AILIM の発現様式は、CD3 だけでなく CD4 及び CD8 の発現との相関性の点においても、CD28 と異なるものであることが明らかとなった。

#### <2-3> マウス正常リンパ組織由来 T 細胞における AILIM の発現の解析

前記方法により、マウスの正常リンパ組織である脾臓及びリンパ節各々の T 細胞における AILIM の発現を解析した。

結果を図 3 に示す。



- 57 -

脾臓組織由来 T 細胞における AILIM 陽性 T 細胞は、胸腺でのそれと比べ少数であり、その比率は約 1 乃至 3 % であった。また、AILIM 陽性細胞のほとんどは、CD4 陽性 CD8 陰性細胞であった。

リンパ節由来 T 細胞における AILIM の発現は、発現様式及び発現細胞の比率とともに、前記脾臓由来 T 細胞でのそれと同様であった。

#### <2-4> マウス肝炎モデル動物の病変組織由来 T 細胞での AILIM の発現の解析

肝炎モデルマウスを下記のように作製した。

C57BL/6 マウスに P.acnes (Propionibacterium acnes ; 5mg/ml) を含むのリン酸緩衝液 (PBS- ; 0.2ml) 溶液を尾静注した。1 週間後、該マウスに LPS (Lipopolysaccharide ; 1.5 µg/ml) を含むリン酸緩衝液 (PBS- ; 0.2ml) を静注することにより肝炎を誘導した。このマウスを肝炎モデル動物として用いた。

LPS 投与から 6.5 時間後、肝臓を採取し、前記方法により T 細胞を取得し、AILIM の発現を解析した。

結果を図 4 に示す。

当該肝炎モデルマウスの肝臓組織由来 T 細胞 (単核細胞) における AILIM の発現は極めて高いものであり、T 細胞のほとんどにおいて顕著な発現が認められた。肝炎モデル肝臓由来 T 細胞での AILIM の発現の程度は、正常マウス脾臓由来 T 細胞 (CD4 陽性細胞) 及びリンパ節由来 T 細胞でのそれに比べ著しく高いものであった。

#### <2-5> 健常人の末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現の解析

健常人末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現、並びに健常人末梢血から分離したヒト単核球細胞での AILIM の発現のレベル及び各種細胞表面マーカーの発現をフローサイトメーターにより解析した。健常人の末梢血 T 細胞は、前記方法により取得した。

一方、AILIM を発現している T 細胞 (AILIM 陽性細胞) は、次のとおり取得した。健常人末梢血より分離した単核球の分画を、0.5%BSA 及び 5mM の EDTA を含

- 58 -

む PBS-で分散した後、抗 AILIM 抗体 (SG430 ; 50  $\mu$ g) を加え 4°C で 30 分間反応させた。次いで、同緩衝液で 3 回洗浄後、ヤギ抗マウス IgG を固定化したマイクロビーズ (100 乃至 500  $\mu$ l ; ミルテニ製) を加えて同様の反応を行い、同緩衝液で洗浄した。次いで、細胞を、常法に従い磁気分離カラム操作 (2 回) に供し、AILIM 陽性細胞を回収した。回収した AILIM 陽性細胞を、各種標識抗体または抗 AILIM 抗体により染色し、フローサイトメーターにより解析した。

結果を、図 24 に示す。

末梢血 T 細胞は、主として CD4 陽性 CD8 陰性細胞と CD4 陰性 CD8 陽性細胞に分けられる。FITC 標識抗 AILIM 抗体 (SA12) と抗 CD4 抗体との共染色では、主に CD4 陽性細胞で AILIM の発現が認められた。抗 CD28 抗体との二重染色により、末梢血 AILIM 陽性細胞のほぼ全てが CD28 を発現していることが分かった。また、末梢血 T 細胞における AILIM 陽性細胞の比率は、概ね 0.5 乃至 5% 程度であった。

一方、ヒト末梢血単核球分画から直接分離した AILIM 陽性細胞における表面マーカーの解析の結果から、下記が判明した。

(1) AILIM 陽性細胞の多くが、CD4 陽性 CD8 陰性細胞であった。

(2) AILIM 陽性細胞の中には、僅かに CD4 陰性 CD8 陽性細胞、及び CD4 陰性 CD8 陰性細胞が認められた。

(3) 抗 CD28 抗体との共染色により、AILIM 陽性細胞のほとんどが CD28 を発現しており、AILIM 陽性細胞のほとんどが T 細胞に分類された。

(4) AILIM 陽性細胞の中には、B 細胞表面マーカーである CD19 に対する抗体で染色される細胞が認められたことから、B 細胞にも僅かに AILIM が発現していることが示された。

(5) AILIM 陽性細胞の多くにおいて、コストимуレトリー分子である CTLA4 の発現が認められた。

さらに、末梢血 T 細胞及び AILIM 陽性細胞の各々での AILIM の発現レベルについても合わせて検討した。

- 59 -

結果を図 25 に示す。

AILIM 陽性細胞での AILIM の発現を、末梢血 T 細胞でのそれと比べるとピークシフトが認められることから、AILIM 陽性細胞では AILIM に発現レベルが高いことが確認された。

また、同様の比較を CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞の各々について行った結果、いずれの分画においても、同程度の AILIM の発現が認められた。CD8 陽性細胞は、AILIM 陽性細胞の中での比率は少ないものの、同様の AILIM の発現が認められた。

<2-6> 各種関節炎または自己免疫疾患に罹患している患者の T 細胞における AILIM の発現の解析

前記方法と同様にして、関節炎（慢性関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）及び変形性関節炎（osteoarthritis; OA）、並びに自己免疫疾患（進行性全身性硬化症（progressive systemic sclerosis; PSS）及び全身性エリテマトーデス systemic lupus erythematosus; SLE）に罹患している患者の T 細胞における AILIM の発現及び AILIM を発現している細胞の比率を分析した。

関節炎患者については、関節腔液及び末梢血の各々から分離した T 細胞を使用した。一方、自己免疫疾患患者からは末梢血から分離した T 細胞を用いた。また、対照として、健常人の末梢血の T 細胞を用いた。

結果を図 5 及び図 26 に示した。

RA 患者の末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現は、CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞（即ち CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞）のいずれにおいても、健常人の末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現と比べ有意な差は認められなかった。

しかしながら、RA 患者の関節腔液由来 T 細胞においては、CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞のいずれにおいても AILIM の発現している細胞の比率が有意に上昇していた。特に、CD4 陽性 T 細胞集団においては、AILIM の発現の平均値が約 20% にまで上昇していた。また、RA 患者の関節腔液由来の CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞の各々における AILIM の発現レベルは、健常人の末梢血の由来の C

- 60 -

D4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞の各々と比べ有意な上昇が認められた。RA 患者の CD4 陽性 T 細胞においては、CD28 の発現レベルの変化は認められなかった。

一方、OA 患者については、1 例ではあるが、関節腔液由来 CD4 陽性細胞において AILIM 陽性細胞の比率が著しく上昇していた。

自己免疫疾患患者の末梢血由来 T 細胞については、CD4 陰性 T 細胞における AILIM 陽性細胞の比率は健常人のそれに比べ差が認められないものの、PSS 患者由来 CD4 陽性 T 細胞においては健常人に比べ AILIM 陽性細胞の比率が有意に上昇していた。

#### <2-7> アジュバント誘発性関節炎ラットモデルにおける AILIM の発現の解析

流動パラフィン（和光純薬製）にて 10mg/ml の濃度に調製した結核死菌（*M. Tuberculosis* H37Ra; Difco）をアジュバントとして、1mg/0.1ml/匹の濃度で Wistar ラット（雄、5 週齢、チャールズリバー製）の尾根部に皮内投与して関節炎を誘発させた。プレシズモメーターを用いて両後肢足容積を計測し当該容積を指標として関節炎の発症を確認した。

アジュバントの投与日（0 日）から経時的に胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血を採取し、前記方法に従って T 細胞分散液を調製した。T 細胞を、前記方法により抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体及び抗 AILIM 抗体の各々で染色し、CD4、CD8 及び AILIM の各々の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

なお、対照には、正常ラットの胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血由来の T 細胞を用いた。

結果を図 27 に示す。

胸腺、脾臓及び末梢血の各々に由来する T 細胞については、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても、対照と比べ AILIM の発現の有意な差を認められなかった。

一方、リンパ節由来 T 細胞については、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても、対照と比べ AILIM 陽性細胞の比率が有意に上昇していた。と

- 61 -

りわけ、CD4 陽性 T 細胞においては、アジュバント投与から 5 日目には、AILIM の発現のピークが認められた。

#### <2-8> マウス T 細胞の活性化に伴う AILIM の発現の変化の解析

マウスのリンパ組織から採取した T 細胞を各種条件下で活性化し、T 細胞の活性化に伴う AILIM の発現の変化を解析した。

T 細胞の活性化は、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に分散した T 細胞に、抗 CD3 抗体（最終濃度：1 乃至 10  $\mu$ g/ml）、コンカナバリン A（Concanavalin A; ConA；最終濃度：1 乃至 5  $\mu$ g/ml）、または PMA（phorbol myristate acetate；最終濃度：20ng/ml）と Ca Ionophore（最終濃度：200ng/ml）を加えて刺激することにより行った。該活性化剤の添加から経時的（0、6、12、24、及び 48 時間）に AILIM の発現を解析した。

結果を図 6 に示す。

いずれの活性化の条件においても、刺激後約 3 乃至 6 時間後に AILIM の発現の上昇が認められ、刺激から 12 時間の時点で最大の AILIM の発現が認められた。AILIM の発現は、刺激から約 24 時間以降においても AILIM の高い発現が認められ、刺激後 48 時間の時点でも同程度の発現レベルが持続されていた。

#### <2-9> ヒト T 細胞の活性化に伴う AILIM の発現誘導の解析

前記と同様にして取得した健常人の末梢血由来 T 細胞を、下記(A)及び(B)の方法により活性化することにより T 細胞の活性化に伴う AILIM 及びコスティミュレーター分子である CTLA-4 の各々の発現を解析した。

##### (A) PMA と Ca Ionophore による T 細胞の活性化

10%FCS 含有 RPMI1640 培地に分散した該ヒト T 細胞（ $1 \times 10^5$  個）に、活性化剤として PMA（最終濃度：20ng/ml）及び Ca Ionophore（最終濃度：200ng/ml）を加えて刺激した。活性化剤添加から 8 時間後に、AILIM 及び CTLA-4 の各々の発現をフローサイトメーターにより解析した。

##### (B) 抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体または抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による活性化

- 62 -

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、D-PBS で希釈した (1) 抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/ウェル) 及び抗 AILIM 抗体 (クローン SA12 ; 1 $\mu$ g/ウェル) または (2) 抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/ウェル) 及び抗 CD28 抗体 (クローン CD28.2 ; 1 $\mu$ g/ウェル) を加え、室温で 3 時間反応させることにより、該プレートを各々の抗体でコーティングした。

各プレートに、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に分散したヒト末梢血由来 T 細胞 (1 $\times 10^5$  個/ml、0.1ml/ウェル) を加え、2 乃至 3 日間培養した。細胞を回収し、前記と同様にして AILIM 及び CTLA-4 の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

結果を図 28 に示す。

PMA と Ionophore による T 細胞の活性化においては、刺激後 8 時間後に著しく高い AILIM の発現が誘導された。また、その発現レベルは、同様に誘導される CTLA-4 の発現レベルに比べ極めて高いものであった。さらに、ほとんど全ての T 細胞において AILIM の発現が誘導された。さらに、CD4 と AILIM、または CD8 と AILIM の二重染色試験の結果から、この活性化により、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても AILIM の有意な発現が誘導されることが分かった。

一方、マイクロプレートにコーティングした抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体、または抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による活性化の試験においては、下記の結果が得られた。

(1) 抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞のいずれにおいても顕著な AILIM の発現誘導が認められた。その発現誘導の程度は、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞での発現誘導の程度よりも、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞における発現の程度の方が高いものであった。

(2) 抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞のいずれにおいても CTLA-4 の発現誘導が認

められた。しかしながら、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞での発現誘導の程度と、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞における発現の程度とに有意な差は認められなかった。

#### <2-10> 各種 T 細胞株での AILIM の発現の解析

T 細胞株は、主に自然発生的に不死化されるか、または科学的に処理して不死化された T 細胞株、または T 細胞をミエローマ細胞と細胞融合して不死化された T 細胞ハイブリドーマが知られている。また、T 細胞株は、該細胞のサイトカイン産生の特性に従い Th1 型 T 細胞株及び Th2 型 T 細胞株に分類される。

前記<1-6>に記載した各種の既知のマウス T 細胞株における AILIM 及び CD28 の発現を前記と同様にしてフローサイトメーターを用いて解析した。

結果を図 7 に示す。

AILIM は、Th2 型 T 細胞株のサイトカイン産生の性状を有する株化 T 細胞 (D10, MS202, CD28K0, EL-4 など) で構成的な (constitutive) な発現が認められた。また、それらの細胞株での AILIM の発現は、CD28 の発現と同等またはそれ以上に高い発現であった。

一方、Th1 型 T 細胞株では、6-13-64 を除いて CD28 の発現は高いものの、AILIM の発現は認められなかった。

#### 実施例 3 抗 AILIM 抗体による T 細胞反応の制御能の有無の検討

本発明の一部を構成する抗 AILIM 抗体が、T 細胞反応 (IFN- $\gamma$  や IL-4 などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など) を制御 (促進及び/または抑制) する能力を有するか否か、即ち AILIM を介したコスティミュレトリートリシグナル (co-stimulatory signal) の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、該細胞からのサイトカイン (IFN- $\gamma$  及び IL-4) の産生量、並びに該細胞の増殖の程度を指標に解析した。

#### <3-1> 試験方法

- 64 -

試験の目的に応じて、前述で準備した 1 または 2 種類の抗体（抗 CD3 抗体のみ、抗 CD28 抗体のみ、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体、または抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体）を 96 穴マイクロプレートに加え、37°C で 1 時間以上反応させて、該プレートを 1 または 2 の該抗体でコーティングした。プレートを PBS で十分に洗浄した後、前記で調製した胸腺細胞（ $5 \times 10^5$  個/well）、脾臓細胞（ $2 \times 10^5$  個/well）または精製 T 細胞（ $1 \times 10^5$  乃至  $3 \times 10^5$  個/well）を播種した。

抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体プレートへのコーティングする代わりに、いずれかを後に添加する試験においては、該抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体は、プレートへの細胞の播種の後に添加した。また、この試験においては、対照として抗 AILIM 抗体の代わりに、CTLA4-Ig（CTLA4 の可溶性領域と IgFc との融合蛋白）を用いて同様にして試験した。

プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 2 乃至 4 日間培養し、培養上清中のサイトカイン（IFN- $\gamma$  または IL-4）の濃度を常法に従って ELISA で測定した。また、培養後の細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン（<sup>3</sup>H-TdR）取込試験により評価した。

### <3-2> 抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体での T 細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達によるサイトカイン産生の誘導の解析

T 細胞は、T 細胞受容体を介する一次シグナル、及び CD28 や CTLA-4 などのコスティミュレイトリー分子を介する副シグナルを受けることによって特徴的なサイトカインを産生することが知られている。

前記<3-1>の試験方法に従って、マウス、ラット及びヒトの各々から取得した末梢血 T 細胞、胸腺細胞または脾臓細胞を用いて、種々の抗体刺激による種々サイトカイン産生の誘導を解析した。

#### <3-2-1> マウス脾臓由来 T 細胞からの IFN $\gamma$ の誘導

(1) 抗 CD3 抗体（クローン 145-2C11；Pharmingen 製；0 乃至  $3 \mu\text{g/ml}$ ）及び抗 CD28 抗体（クローン CD28.2； $1 \mu\text{g/well}$ ）をコーティングしたマイクロプレー



- 65 -

ト、(2)抗 CD3 抗体及び抗マウス AILIM 抗体 (クローン B10.5 ; 1 $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗 CD3 抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、マウス脾臓由来 T 細胞を加え培養し、培養上清中の IFN $\gamma$  の量を ELISA により測定した。

結果を図 8 に示す。

抗 CD3 抗体のみの刺激では IFN $\gamma$  の産生は誘導されないものの、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による刺激のいずれにおいても IFN $\gamma$  の有意な産生誘導が認められた。また、その産生誘導は、抗 CD3 抗体の濃度に依存して増大した。

#### <3-2-2> ラット脾臓由来 T 細胞からの IFN $\gamma$ の産生誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン G4.18 ; 50ng/well) 及び抗 CD28 抗体 (クローン JJ3 16 ; 1 $\mu$ g/well) をコーティングしたマイクロプレート、(2)抗 CD3 抗体及び抗ラット AILIM 抗体 (クローン JTT1 ; 1 $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗 CD3 抗体のみでコーティングしたマイクロプレート、(4)抗 AILIM 抗体のみでコーティングしたマイクロプレート、及び(5)抗 CD28 抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、ラット脾臓由来 T 細胞を加え培養し、培養上清中の IFN $\gamma$  の量を ELISA により測定した。

結果を図 9 に示す。

抗 CD3 抗体のみ、抗 AILIM 抗体のみ、及び抗 CD28 抗体のみの刺激では、いずれの場合も IFN $\gamma$  の有意な産生は認められないものの、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による刺激のいずれにおいても IFN $\gamma$  の有意な産生誘導が認められた。また、その産生誘導は、経時的に増大した。

#### <3-2-3> ヒト末梢血由来 T 細胞からの IFN $\gamma$ の産生誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 一定濃度) 及び抗 AILIM 抗体 (クローン SA1-2 ; 各種濃度) をコーティングしたマイクロプレート、及び(2)抗 CD3 抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、ヒト末梢血由来 T 細胞を加え培養

- 66 -

し、培養上清中の IFN $\gamma$  の量を ELISA により測定した。なお、(2) の試験においては、抗 AILIM 抗体を溶液として細胞添加の後に加えた。

結果を図 10 に示す。

一定濃度の抗 CD3 抗体のみをコーティングしたマイクロプレートに T 細胞を加え、抗 AILIM 抗体を溶液として細胞添加の後に加えた試験においては、抗 AILIM 抗体の濃度を 20  $\mu$ g/ml まで増加させても細胞からの IFN $\gamma$  の産生誘導は認められなかった。

一方、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をともにコーティングしたマイクロプレートで培養したヒト T 細胞からは、抗 AILIM 抗体の濃度が 5  $\mu$ g/ml 以上の場合に、顕著な IFN $\gamma$  の産生誘導が認められた。

また、ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、前記と同様にして抗 AILIM 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該 T 細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進された。また、この結果は、ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、抗 CD28 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等であった。

<3-2-4> ヒト末梢血由来 T 細胞からの TNF  $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-2、IL-4 及び IL-10 の産生誘導

(1) 抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/well) のみをコーティングしたマイクロプレート、(2) 抗 CD28 抗体 (クローン CD28.2 ; 1  $\mu$ g/well) のみをコーティングしたマイクロプレート、(3) 抗ヒト AILIM 抗体 (クローン SA12 ; 1  $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート、(4) 抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体でコーティングしたマイクロプレート、(5) 抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体でコーティングしたマイクロプレート、及び(6) 抗 CD3 抗体、抗 AILIM 抗体及び抗 CD28 抗体でコーティングしたマイクロプレートの各々に、異なる 2 名の健常人ドナーの末梢血から所得した T 細胞の各々を加え培養し、経時的 (18、40 及び 64 時間) に

- 67 -

培養上清中の  $\text{TNF } \alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、 $\text{IFN } \gamma$  (interferon- $\gamma$ )、 $\text{IL-2}$  (interleukin-2)、 $\text{IL-4}$  (interleukin-4) 及び  $\text{IL-10}$  (interleukin-10) の各々の量を ELISA により測定した。

なお、 $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IFN } \gamma$  及び  $\text{IL-2}$  は、 $\text{Th1}$  型 T 細胞が産生するサイトカインであり、 $\text{IL-4}$  及び  $\text{IL-10}$  は  $\text{Th2}$  型 T 細胞が産生するサイトカインである。

結果を図 29 に示す。下記の結果が得られた。

(1)  $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IFN } \gamma$  及び  $\text{IL-2}$  の産生誘導については、ドナー間での差違は認められなかった。

(2)  $\text{TNF } \alpha$  及び  $\text{IFN } \gamma$  については、抗 CD3 抗体単独による刺激でも両者の産生誘導が認められた。

(3) 抗 CD3 抗体単独による刺激による  $\text{TNF } \alpha$  及び  $\text{IFN } \gamma$  の各々の産生誘導の程度に比べ、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激のいずれの刺激によっても、 $\text{TNF } \alpha$  及び  $\text{IFN } \gamma$  の各々の産生誘導が相加的に上昇した。

(4)  $\text{IL-2}$  については、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激、並びに抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激により最も高い  $\text{IL-2}$  の産生誘導が認められた。

(5)  $\text{Th2}$  サイトカインである  $\text{IL-4}$  及び  $\text{IL-10}$  については、それらの産生誘導にドナー間の差違が認められた。これは、ヒト個体間での構成 T 細胞の差違を反映している可能性が推察された。

(6)  $\text{IL-4}$  については、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激、並びに抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激により最も高い  $\text{IL-4}$  の産生誘導が認められた。

- 68 -

(7) IL-10 については、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激、並びに抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激により、IL-10 の顕著な産生誘導が認められた。さらに、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体の 3 抗体による刺激により最も高い IL-10 の産生誘導が認められた。

前記試験の結果は、プレートにコーティングした抗 CD3 抗体が抗原提示細胞上の MHC として働き、同コーティングした抗 AILIM 抗体が AILIM のリガンドとして働き、結果として、加えた T 細胞の細胞内に、T 細胞の活性化に必要な第 1 のシグナルと副刺激シグナル（コスティミュレイトリーシグナル）が伝達されたことを示している。

<3-3> CD3 を介したシグナルにより誘導された T 細胞反応としてのサイトカイン産生誘導の抗 AILIM 抗体による抑制

T 細胞を、抗 CD3 抗体をコーティングしたマイクロプレート中で培養することにより誘導される T 細胞反応としての IFN $\gamma$  及び IL-4 の産生誘導を、抗 AILIM 抗体及び抗 CD28 抗体の各々が抑制するか否かを検討した。

抗 CD3 抗体のみをコーティングしたマイクロプレートに、末梢血由来 T 細胞、胸腺由来 T 細胞または脾臓由来 T 細胞を蒔き、次いで抗 AILIM 抗体（各種濃度）、抗 CD28 抗体（各種濃度）または CTLA4-IgFc（対照）のいずれかを加え、培養上清中の IFN $\gamma$  または IL-4 の量を前記<3-1>の方法に従って解析した。

結果を図 11、図 12、図 13 及び図 14 に示す。

抗 CD3 抗体による刺激により誘導される末梢血由来 T 細胞からの IFN $\gamma$  及び IL-4 の産生のいずれもが、抗 AILIM 抗体の添加により有意に抑制された（図 11 及び図 12）。また、抗 AILIM 抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、抗 CD28 抗体の添加では、サイトカイン産生の抑制及び細胞増殖の抑制のいずれも認められなかった。

抗 CD3 抗体による刺激により誘導される胸腺由来 T 細胞からの IL-4 の産生は、抗 AILIM 抗体の添加により著しく阻害された (図 13)。また、抗 AILIM 抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、対照としての CTLA4-IgFc の添加によっては、IL-4 産生の有意な抑制並びに細胞増殖の抑制は認められなかった。

抗 CD3 抗体による刺激により誘導される脾臓由来 T 細胞からの IL-4 の産生は、抗 AILIM 抗体の添加により著しく阻害された (図 14)。また、抗 AILIM 抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、対照としての CTLA4-IgFc の添加によっては、IL-4 産生の有意な抑制及び細胞増殖の抑制は認められなかった。

<3-4> 抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体での T 細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達による T 細胞の細胞増殖の誘導の解析

T 細胞は、T 細胞受容体を介する一次シグナル、及び CD28 や CTLA-4 などのコスティミュレイトリー分子を介する副シグナルを受けることによって増殖する。

前記<3-1>の試験方法に従って、健常人の末梢血由来 T 細胞、マウス脾臓細胞、マウス脾臓由来 T 細胞、及びラットリンパ節 T 細胞の各々を用いて、種々の抗体刺激による細胞の増殖の誘導を解析した。

<3-4-1> ヒト末梢血由来 T 細胞の増殖の誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/well ; Ortho Diagnostic Systems 製) のみをコーティングしたマイクロプレート、(2)抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体 (クローン CD28.2 ; 種々濃度 ; Pharmingen 製) をコーティングしたマイクロプレート、(3)抗 CD3 抗体 (200ng/well) 及び抗 AILIM 抗体 (クローン SA12;各種濃度) をコーティングしたマイクロプレート、及び(4)抗 CD3 抗体 (200ng/well)、抗ヒト AILIM 抗体 (種々濃度) 及び抗 CD28 抗体 (1  $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレートの各々に、ヒト末梢血由来 T 細胞を加え培養し、細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン ( $^3$ H-TdR) 取込試験により経時的に評価した。

結果を図 30 に示す。本試験により下記の結果が得られた。

- 70 -

(i) ヒト末梢血由来 T 細胞は、前記(2)乃至(4)のいずれの刺激によっても有意に増殖した。また、該増殖は、プレートにコーティングした抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度に依存するものであった。

(ii) T 細胞の最大増殖誘導活性は、前記(2)乃至(4)のいずれの抗体コーティングプレートによる刺激であってもほぼ同程度であった。

次いで、前記各種抗体の刺激によるヒト末梢血由来 T 細胞の経時的な増殖誘導活性を検討するため、下記(5)、(6)及び(7)のマイクロプレートを用いて前記と同様にして T 細胞の増殖の程度を測定した。

(5)抗 CD3 抗体 (200ng/well) 及び抗 CD28 抗体 (1 $\mu$ g/well) をコーティングしたマイクロプレート、(6)抗 CD3 抗体 (200ng/well) 及び抗 AILIM 抗体 (1 $\mu$ g/well) をコーティングしたマイクロプレート、及び(7)抗 CD3 抗体 (200ng/well)、抗ヒト AILIM 抗体 (1 $\mu$ g/well) 及び抗 CD28 抗体 (1 $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート。

結果を図 31 に示す。

T 細胞の増殖は、いずれの組み合わせの抗体による刺激においても刺激後 18 時間目以降で認められた。抗体による刺激後 40 時間においては、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体との組み合わせによる刺激（前記(5)）において最も強い T 細胞の増殖誘導が認められたものの、当該組み合わせによる T 細胞増殖誘導活性は既に平衡に達していた。

一方、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激（前記(6)）及び 3 種類の抗体による刺激（前記(7)）での T 細胞の増殖誘導活性は、刺激後 60 時間目にピークが認められた。また、これら 2 つの組み合わせによる刺激による刺激後 60 時間目の T 細胞の増殖誘導活性は、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の組み合わせによるそれよりも有意に高いものであった。

<3-4-2> マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞の増殖誘導

<3-4-2-1> 抗体固定化マイクロプレートでの細胞増殖誘導

- 7 1 -

96 穴マイクロプレートに抗 CD3 抗体（クローン 145-2C11; Pharmingen 製 ; 50 ng/well）でコーティングした。次いで、該プレートを各種濃度の抗マウス AILIM 抗体（クローン B10.5）または対照抗体である抗 NP-KLH 抗体でコーティングした。各々の抗体に、マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞の各々を加え培養し、常法に従ってトリチウム標識チミジン（ $^3\text{H}$ -TdR）取込試験により細胞増殖の程度を測定した。

なお、対照抗体である抗 NP-KLH 抗体の調製のための抗原としては、KLH（keyhole limpet hemocyanin、ピアース（PIERCE）社製）にハプテンである NP（Nitrophenol）を結合させた NP-KLH を用いた。

結果を図 32 に示す。

マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞のいずれも、対照抗体である抗 NP-KLH 抗体の刺激によっては増殖が認められなかった。一方、いずれの細胞においても、抗 AILIM 抗体の刺激により抗 AILIM 抗体の濃度依存的に有意な増殖が認められた。

#### <3-4-2-2> 抗体固定化マイクロビーズでの細胞増殖誘導（その 1）

抗体を固定化する担体としてマイクロプレートの代わりにラテックスマイクロビーズを用いて前記と同様な細胞増殖試験を行った。

D-PBS 中で、 $1 \times 10^7$  個のビーズあたり、(1)  $1 \mu\text{g/ml}$  の抗 CD3 抗体（クローン 145-2C11; Pharmingen 製）と各種濃度の抗 AILIM 抗体（クローン B10.5）、または (2)  $1 \mu\text{g/ml}$  の抗 CD3 抗体と各種濃度の抗 NP-KLH 抗体を加えて 1 時間以上反応させ、D-PBS で洗浄して抗体をビーズに固定化した。

96 穴マイクロプレートを用いて、10%FCS 含有 RPMI1640 培地中に分散させた C57BL/6 マウスの脾臓細胞（ $1 \times 10^5$ /well）に、該ビーズ（ $1 \times 10^5$  個/well）を加え 56 時間反応させた。反応後の細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン（ $^3\text{H}$ -TdR）取込試験により細胞増殖の程度を測定した。

結果を図 33 に示す。

C57BL/6 マウス脾臓細胞は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激のいずれによっても増殖が誘導された。また、細胞増殖の程度は、ビーズに固定化した抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度の増大（抗 CD3 抗体の濃度に対する抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度の比率の増大）に依存して上昇した。また、細胞増殖の程度は、抗 CD3 抗体の濃度と抗 AILIM 抗体の濃度の比率、及び抗 CD3 抗体の濃度と抗 CD28 抗体の濃度の比率がともに 1 : 9 において最大であった。

#### <3-4-2-3> 抗体固定化マイクロビーズでの細胞増殖誘導（その 2）

前記<3-4-2-2>の結果に基づき、抗 CD3 抗体の濃度と抗 AILIM 抗体の濃度の比率、及び抗 CD3 抗体の濃度と抗 CD28 抗体の濃度の比率がともに 1 : 9 の条件で抗体コーティングしたラテックスビーズを用いて、前記と同様にマウス細胞の細胞増殖を解析した。

なお、本試験においては、マウス脾臓細胞の分散液（ $1 \times 10^5$ /well）に加える抗体コーティングマイクロビーズの濃度を各種濃度に設定した。

また、本試験においては、マウス細胞として、BALB/C マウスの脾臓細胞及び BALB/C マウスの脾臓由来 T 細胞の各々を用いた。

また、対照として、抗 CD3 抗体のみを固定化したマイクロビーズを用いて同様にして試験を行った。

結果を図 34 及び図 35 に示す。

BALB/C マウス脾臓細胞及び BALB/C マウス脾臓由来 T 細胞のいずれも、(1)抗 CD3 抗体単独による刺激、(2)抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激、及び(3)抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激のいずれによっても増殖が誘導された。

また、その細胞増殖は、細胞に加えたマイクロビーズの濃度（即ち、抗体の濃度）の増大に依存して上昇した。

BALB/C マウス脾臓細胞及び BALB/C マウス脾臓由来 T 細胞のいずれにおいても、細胞に加えたマイクロビーズの濃度が 30,000 個/well の時に最大の細胞増殖が



- 73 -

誘導された。この結果は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をコーティングしたビーズを用いた場合も、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコーティングしたマイクロビーズを用いた場合も同様であった。

#### <3-4-3> ラットリンパ節 T 細胞の増殖誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン G4.18 ; 50ng/well) と抗 CD28 抗体 (クローン JJ31 9 ; 種々濃度 ; Pharmingen 製) をコーティングしたマイクロプレート、(2)抗 CD3 抗体 (50ng/well) 及び抗 AILIM 抗体 (各種濃度) をコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗 CD3 抗体 (50ng/well) 及び陰性対照抗体 MOPC21 (種々濃度 ; Pharmingen 製) をコーティングしたマイクロプレートの各々に、10%FCS 含有 RPMI1640 培地中に分散したラットリンパ節 T 細胞 ( $1 \times 10^5$  個/well) を加え 37°C で 44 時間培養し、培養終了 6 時間前に 0.5  $\mu$ Ci/well のトリチウム標識チミジン ( $^3$ H-TdR) を加えた。培養後、細胞を回収し、TOPCOUNT (PACKARD 製) にてトリチウム標識チミジン ( $^3$ H-TdR) の細胞への取込量を測定し、該取込量を指標として細胞増殖の程度を解析した。

結果を図 36 に示す。本試験により下記の結果が得られた。

ラットリンパ節 T 細胞は、抗 CD3 抗体単独による刺激のみでは増殖誘導されないものの、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激及び抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激のいずれの刺激によっても有意に増殖した。また、該増殖は、プレートにコーティングした抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度に依存するものであった。

#### 実施例 4 抗 AILIM 抗体による関節症の治療効果

##### <4-1> 抗 AILIM 抗体の複数回投与試験

Wistar ラット (雄、5 週齢、チャールズリバー製) に、流動パラフィンで 10mg/ml に調製した結核死菌 (M.Tuberculosis H37Ra; Difco) をアジュバントとして用い、0.1ml/匹の濃度で尾根部に皮内投与し (1mg/0.1ml/匹) 関節症を誘導し

- 74 -

た。アジュバント投与日（0日）から7日後に両後肢足容積をプレシズモメーターで測定し、両後肢足容積を指標に群分けした（各群8匹）。

アジュバント投与日（0日）から7日後に、その内の1群に抗ラット AILIM 抗体（JTT-2 抗体；JMab50 と同別称する；20mg/kg）を静注した。該抗体は、初回投与の後は1週間に2回の割合で初回投与から20日目まで投与した。アジュバント投与から経時的に両後肢足容積をプレシズモメーターで測定した。

なお、アジュバント及び抗体のいずれも投与しない正常ラット群（4匹）、及び陰性対照として抗ラット AILIM 抗体の代わりにマウス抗ヒト CETP 抗体（クローン JHC1；JMab109 と同別称する；日本特許出願公開第9-20800号公報）を同様にして投与した群を対照とし、同様にしてプレシズモメーターで両後肢足容積を測定した。

結果を図15に示す。

驚くべきことに、抗 AILIM 抗体を投与群では、足腫れが完全に抑制され、関節炎を誘導していない正常ラット群とほぼ同じ結果であった。

#### <4-2> 抗 AILIM 抗体の単回投与試験（その1）

前記で得た結果に基づき、抗 AILIM 抗体の単回投与による関節炎の治療効果を前記と同様にして検討した。

但し、本試験においては、抗 AILIM 抗体または陰性対照抗体の投与は、アジュバント投与日（0日）から3、5または7日後に、抗ラット AILIM 抗体（JTT-2 抗体；JMab50 と同別称する；20mg/kg）または陰性対照抗ラット CETP 抗体（JHC1；20mg/kg）を一回のみ静注した。

結果を図37に示す。

抗 AILIM 抗体の投与が単回であるにも拘らず、アジュバント投与から3、5及び7日目のいずれの単回投与によっても、足腫れが有意に抑制され、特にアジュバント投与から7日目に抗 AILIM 抗体を投与した群では、足腫れがほぼ100%抑

- 75 -

制された。この抑制の程度は、関節炎を誘導していない正常ラット群の値とほぼ同じであった。

#### <4-3> 抗 AILIM 抗体の単回投与試験（その 2）

前記<4-2>の結果に基づき、本試験で用いた関節炎モデルにおいて抗 AILIM 抗体が関節炎治療効果を発揮するための抗 AILIM 抗体の用量を前記と同様の方法により検討した。

本試験においては、アジュバント投与から 7 日目に、抗ラット AILIM 抗体（JTT-2 抗体；JMab50 と同別称する）を、1、3、10 または 20mg/kg の濃度で 1 回のみ静注した。

また、比較のため、JTT-2 とは別の抗ラット AILIM 抗体（JTT-1；JMab-49 と別称する；20mg/kg）を同様に単回投与した。

陰性対照については、抗ラット CETP 抗体（JHC1；20mg/kg）を一回のみ静注した。

結果を図 38 に示す。

抗 AILIM 抗体を 1、3、10 または 20mg/kg のいずれの用量で単回投与した場合でも、足腫れがほぼ 100%抑制され、関節炎を誘導していない正常ラットと同様のレベルまで抑制した。また、驚くべきことに、この抑制効果は、極めて低用量である 1 mg/kg でも発揮されていた。

#### 実施例 5 抗 AILIM 抗体による肝炎の治療効果

C57BL/6 マウスに、P.acnes (Propionibacterium acnes) のリン酸緩衝液 (PBS) 溶液を静注した。P.acnes 投与 (0 日) から 1 週間後、該マウスに LPS (Lipopolysaccharide) の PBS 溶液を静注し肝炎を誘発した。LPS 投与の 6.5 時間後に眼底より採血し、血漿中の IFN- $\gamma$  の濃度を ELISA により測定した。また、血漿中の GOT (glutamic-oxaloacetic transaminase) 及び GPT (glutamic-pyruvic transaminase) の濃度を生化学検査装置 (Fara) で測定した。

- 76 -

P.acnes 投与（0日）から1、2及び3日目に、抗マウス AILIMモノクローナル抗体（B10.5 抗体；5, 50, 500 $\mu$ g/匹）を腹腔内投与し、抗 AILIM 抗体による肝炎の改善効果を評価した。

なお、抗マウス AILIM 抗体を投与しない群を対照とした。

結果を図 16 及び図 17 に示す。

抗 AILIM 抗体の投与により、抗体濃度依存的に血中の IFN- $\gamma$  の上昇が有意に抑制された。また抗 AILIM 抗体（50 $\mu$ g/匹）を投与した場合に、GOT 及び GPT の上昇が有意に抑制された。

実施例 6 抗 AILIM 抗体による移植片対宿主病（GVHD）の治療効果

#### <6-1> 試験 1

BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを交配して得た F1 マウス（8乃至10週齢、3匹）に、BALB/c マウスの脾臓細胞（ $8 \times 10^7$  個/匹）を静注し GVHD を誘導した。該脾臓細胞投与直後（0時間）及び12時間後の各々に抗マウス AILIMモノクローナル抗体（B10.5 抗体；400 $\mu$ g/匹）を静注し、該脾臓細胞投与の24、48及び72時間後の各々に同 B10.5 抗体（200 $\mu$ g/匹）を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後（0日）、1、2、3及び6週間後の各々に採血し、血清中の IgG1、IgE 及び抗 dsDNA 抗体価を常法により測定した。なお、抗 dsDNA 抗体価の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗 dsDNA 抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗 AILIM 抗体の代わりに、hCTLA4-Ig（ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白）を同様に投与した群を陽性対照とした。また、抗 AILIM 抗体の代わりに PBS を同様に投与した群を陰性対照とした。

結果を図 18、図 19 及び図 20 に示す。

抗 AILIM 抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH 反応（graft versus host reaction）の指標である血清中の IgG の上昇、IgE の上昇、及び抗 dsDNA

- 77 -

抗体価の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Ig を投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった。

#### <6-2> 試験 2

BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを交配して得た F1 マウス（8 乃至 10 週齢、3 匹）に、BALB/c マウスの脾臓細胞（ $1 \times 10^8$  個/匹）を静注し GVHD を誘導した。該脾臓細胞投与直後（0 時間）及び 12 時間後の各々に抗マウス AILIM モノクローナル抗体（B10.5 抗体； $200 \mu\text{g}/\text{匹}$ ）を静注し、該脾臓細胞投与の 24、48 及び 72 時間後の各々に同 B10.5 抗体（ $100 \mu\text{g}/\text{匹}$ ）を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後（0 日）、1、2、3、6、9 及び 12 週間後の各々に採血し、血清中の IgG1、IgE 及び抗 dsDNA 抗体価を常法により測定した。なお、抗 dsDNA 抗体価の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗 dsDNA 抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗 AILIM 抗体の代わりに、hCTLA4-Ig（ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白）を同様に投与した群を陽性対照とした。また、抗 AILIM 抗体の代わりに PBS を同様に投与した群を陰性対照とした。

結果を図 39、図 40 及び図 41 に示す。

抗 AILIM 抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH 反応（graft versus host reaction）の指標である血清中の IgG の上昇、IgE の上昇、及び抗 dsDNA 抗体価の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Ig を投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった。

#### 実施例 7 抗 AILIM 抗体による抗外来抗原抗体産生の抑制効果

##### <7-1> 羊赤血球（SRBC）で免疫感作したマウスでの抗 SRBC 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果

BALB/c マウス（雌、5 週齢）に、羊赤血球（SRBC；Sheep red blood cell； $1 \times 10^8$  個/匹）を静注した。SRBC 投与（0 日）の直後または SRBC 投与から 7 日後

- 78 -

に抗マウス AILIM モノクローナル抗体 (B10.5 抗体 ; 50 または 500  $\mu$ g/匹) を静注した。SRBC 投与から経時的に採血し血清中の抗 SRBC 抗体の産生量を常法に従って ELISA により測定した。

なお、抗 AILIM 抗体の代わりに、hCTLA4-Ig (ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を同様に投与した群を陽性対照とした。また、抗 AILIM 抗体の代わりに PBS を同様に投与した群を陰性対照とした。

結果を図 21 及び図 22 に示す。

抗 AILIM 抗体を投与した群では、該抗体を SRBC による感作直後投与した群においてもまた 7 日後に投与した群においても、陰性対照群に比べ、外来抗原としての SRBC に特異的な IgG 抗体の産生が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Ig を投与した陽性対照群の値よりも高いものであった。

一方、hCTLA4-Ig を投与した群では、該 hCTLA4-Ig を SRBC による感作直後に投与した群では、陰性対照に比べ抗 SRBC 抗体の産生が有意に抑制されたものの、SRBC 感作から 7 日後の投与では有意な抑制は見られなかった。

<7-2> NP-KLH で免疫感作したマウスでの抗 NP-KLH 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果

C57BL/6 マウスに、CFA (完全フロインドアジュバント) 及び NP-KLH (KLH (keyhole limpet hemocyanin) にハプテンである NP (Nitrophenol) を結合させたもの。100  $\mu$ g/マウス) を腹腔内投与した。該抗原の投与の直後 (0 時間) 及び 12 時間後の各々に、抗マウス AILIM 抗体 (クローン B10.5 または B9.B6 のいずれか ; 200  $\mu$ g/マウス) を尾静脈に投与した。また、該抗原投与から 24 及び 48 時間後の各々に該抗 AILIM 抗体のいずれかを腹腔内投与した。

NP-KLH 投与から経時的に採血し血清中の NP-KLH に特異的な抗体 (IgG1、IgG2a、IgG2b 及び IgM の各々) の産生量を常法に従って ELISA により測定した。な

- 79 -

お、該 ELISA には、NP を結合させた牛血清アルブミン (BSA) をキャプチャー抗原として用いた。

なお、陰性対照としては、リン酸緩衝液を用い、また陽性対照としては、hCTL A4-Ig (ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を用いて上記と同様にして試験した。

結果を図 42、図 43、図 44、図 45 及び図 46 に示す。

陰性対照抗体の投与群では、抗 NP-KLH 抗体の産生が経時的に上昇しており、該陰性対照抗体は抗 NP-KLH 抗体の産生を抑制しなかった。

一方、抗 AILIM 抗体投与群では、抗 NP-KLH 抗体の産生もが有意に抑制され、この抑制効果は、陽性対照である CTLA4-IgFc による抗 NP-KLH 抗体の抑制効果とほぼ同じであった。

また、抗 AILIM 抗体投与群では、IgG1、IgG2a、IgG2b 及び IgM のいずれの抗体クラスに属する抗 NP-KLH 抗体の産生もが有意に抑制された。

#### 実施例 8 抗 AILIM 抗体の混合リンパ球反応 (MLR) の制御活性の解析

抗 AILIM 抗体が、T 細胞反応 (IFN- $\gamma$  や IL-4 などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など) を制御 (促進及び/または抑制) する能力を有するか否か、即ち AILIM を介したコスティミュレイトリーシグナル (co-stimulatory signal) の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、アロジェニック混合リンパ球反応 (allogenic mixed lymphocyte reaction; allogenic MLR) における T 細胞の増殖 (即ち、細胞内での DNA 合成) を制御する活性の有無を指標に解析した。

##### <8-1> ヒト PBMC 及び T 細胞の調製

健康人 (7 人; ドナー A, B, C, D, E, F 及び G) の各々から採取した各々の末梢血 (200ml) を、マイクロチューブ (50ml; Falcon 製) に分注した Lymphoprep (15ml; Nycomed 製) に重層した。次いで、遠心分離 (1600 回転、10 分) の後、中間層を回収した。回収した細胞を、リン酸緩衝液で 2 倍以上に希釈した後、遠心分離 (1,800 回転、10 分) して、PBMC (末梢血単核球細胞;  $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$  細

- 80 -

胞)を調製した。血球計数板を用いて細胞数を計数し、MLR 試験に必要な細胞数 ( $1.08 \times 10^8$  細胞/9 マイクロプレート) を分取し、氷上に保存した。残りの細胞は、以下の T 細胞の分離に用いた。

PBMC からの T 細胞の分離には、PanT Isolation キット (Miltenyi Biotech 製) を用いた。該キットの添付の実験操作マニュアルに従って、該残りの PBMC を、該キットに付属の溶液に添加し、反応させた。次いで、細胞を 5mM の EDTA 及び 0.5% BSA 含有 PBS で洗浄した後、該 PBS 中に再懸濁した。次いで、該細胞懸濁液を、該 PBS で膨潤させた Positive Selection Column VS+ (Miltenyi Biotech 製) に添加し、非吸着画分を回収した。また、該カラムに該 PBS を添加して、洗浄液を回収した。同様の操作を再度行った。回収液を併せて、T 細胞画分とした。該 T 細胞画分を、遠心した後、該 PBS 中に再懸濁した。得られた T 細胞の細胞数を、血球計数板を用いて計数し、以下の試験に用いた。

#### <8-2> 混合リンパ球反応 (MLR)

先に述べたとおり、T 細胞等のリンパ球の活性化に必要なコストイミュレイトリーシグナルの伝達経路には、既に比較的十分な解析がなされている CD28 と CD80(B7-1)/CD86(B7-2) との間のシグナル伝達経路、及び CTLA4 と CD80(B7-1)/CD86(B7-2) との間のシグナル伝達経路の 2 つの経路が知られている。

即ち、混合リンパ球反応 (MLR) における T 細胞の増殖は、該既知の 2 つの経路を介するシグナル伝達によっても誘導される。

従って、本試験では、下記の被験物質を用いて、(1) CTLA4 を介するシグナル伝達経路の遮断による MLR の抑制、(2) CD80(B7-1)/CD86(B7-2) を介するシグナル伝達経路の遮断による MLR の抑制、及び (3) AILIM が担う第 3 のシグナル伝達経路の遮断による MLR の抑制の各々について解析した。

下記を、被験物質として用いた。

- (1) 抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体 SA12 (前記実施例に同じ)。
- (2) マウス IgG 抗体 (抗ヒト CD34 ; 陰性対照 ; Immunotech 製)。



- 8 1 -

(3) 抗ヒト CD80 モノクローナル抗体 (Pharmingen 製) と抗ヒト CD86 モノクローナル抗体 (Pharmingen 製) との混合物。

(4) ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子 (Ansell 製)。

前記<8-1>で得た各ドナーから調製した PBMC 及び T 細胞を用いて、下記の 6 通りの組み合わせによる混合リンパ球反応 (MLR) を行った。

- (i) T 細胞 (ドナーA) / PBMC (ドナーD)
- (ii) T 細胞 (ドナーD) / PBMC (ドナーB)
- (iii) T 細胞 (ドナーC) / PBMC (ドナーA)
- (iv) T 細胞 (ドナーE) / PBMC (ドナーG)
- (v) T 細胞 (ドナーF) / PBMC (ドナーE)
- (vi) T 細胞 (ドナーG) / PBMC (ドナーF)

試験に用いる PBMC 及び T 細胞は、下記の濃度に調整した。

PBMC を PBS 中に分散した後、培養皿 (60mm) 移し、放射線照射装置 (日立メディコ製) で X 線照射 (50Gy) した。細胞を回収して遠心した後、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に加え、細胞数を、 $2 \times 10^5$  細胞 /  $50 \mu\text{l}$  に調整した。

また、上記で得た各々のドナーからの T 細胞を、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に加え、細胞数を、 $1 \times 10^5$  細胞 /  $50 \mu\text{l}$  に調整した。

#### <8-2-1> MLR に対する抗 AILIM 抗体による MLR の抑制

96 穴 U 底マイクロプレートの中の各ウェルに 10%FCS 含有 RPMI1640 培地を加えた後、10%FCS 含有 RPMI1640 培地で各種濃度に希釈した抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体 SA12 の溶液を加えた (最終濃度: 0、0.31、1.25、5 及び  $20 \mu\text{g/ml}$ )。次いで、T 細胞 ( $50 \mu\text{l}$ ) を加え、 $\text{CO}_2$  インキュベーター (NAPCO 製) 内で、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間培養した。反応終了後、別のドナー由来の PBMC ( $50 \mu\text{l}$ ) を加え、MLR を開始させた。

なお、被験物質として抗ヒト AILIM 抗体以外を用いた場合の MLR は、PBMC と該被験物質との培養の後に、別のドナー由来の T 細胞を加えて反応を行った。

- 82 -

培養の5日目に、各ウェルに、10%FCS含有RPMI1640培地で希釈したトリチウム標識チミジン ( $^3\text{H}$ -Thymidine;  $20\mu\text{l}$ ;  $1\mu\text{Ci/well}$ ) を添加した後さらに1日培養して。培養後、Cell Harvester (Packard 製) を用いて細胞を回収し、 $\beta$  カウンター (TOP COUNT; Packard 製) を用いて、細胞に取込まれている  $^3\text{H}$  の放射活性を測定し、培養後の T 細胞の増殖の程度を解析した。

結果を図 47、図 48、図 49、図 50、図 51、及び図 52 に示す。

この結果、下記が明らかとなった。

(1) CTLA4-IgFc は、CTLA-4 を介するシグナル伝達を遮断することによりアロジェニック MLR による T 細胞の増殖を抑制する。

(2) 抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体は、CTLA4 及び CD28 のリガンドである CD80/CD86 を介するシグナル伝達を阻害することによりアロジェニック MLR による T 細胞の増殖を抑制される。

(3) CTLA4-IgFc、抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体と同様に、ヒト AILIM に対する抗体が抗体濃度依存的に、AILIM を介するシグナル伝達によるアロジェニック MLR での T 細胞の増殖を有意に抑制する。

(4) 抗 AILIM 抗体による MLR の抑制は、いずれのドナー由来の PBMC 及び T 細胞での組合わせにおいても有意に認められる。

この結果は、即ち、T 細胞の活性化に必要なコスティミュレイトリーシグナルの伝達経路には、既知の CTLA4/CD80/CD86 を介する経路及び CD28/CD80/CD86 を介する経路の他に、AILIM とそのリガンドを介する第 3 の経路が存在すること、並びに該 AILIM を介するシグナル伝達経路が、AILIM に対する抗体により阻害されることを示すものである。

さらに、該シグナル伝達における AILIM を介する経路の貢献度は、CTLA4/CD80/CD86 を介する経路及び CD28/CD80/CD86 を介する経路のそれと同程度である可能性が示された。

### 産業上の利用の可能性

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する下記に挙げるような種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、膵炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、炎症性腸疾患、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、細菌やウイルスによる感染により惹起される種々の症状（例えば、炎症）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、種々の皮膚疾患（例えば、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、乾癬、強皮症）、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。

また、本発明の医薬組成物に含まれる AILIM に対するヒト抗体を含んでなる医薬組成物は、マウス由来の抗体をヒトに投与する際のアレルギー等の副作用を全く惹起しないことから医薬品として極めて有用である。

- 8 4 -

### 請求の範囲

1. AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。
2. 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項 1 に記載の医薬組成物。
3. 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。
4. 該関節症が、関節リウマチであることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載の医薬組成物。
5. 該関節症が、変形性関節症であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載の医薬組成物。
6. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬組成物：
  - a) AILIM に結合する抗体またはその一部；
  - b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
  - c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
  - d) AILIM に結合するポリペプチド。

- 8 5 -

8. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

9. 該非蛋白性物質が、DNA、RNA または化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項 8 に記載の医薬組成物。

10. AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

11. 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項 10 に記載の医薬組成物。

12. 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする請求項 11 に記載の医薬組成物。

13. 該炎症が、肝炎であることを特徴とする請求項 10 乃至請求項 12 のいずれかに記載の医薬組成物。

14. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項 10 乃至請求項 13 のいずれかに記載の医薬組成物。

15. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項 14 に記載の医薬組成物：

a) AILIM に結合する抗体またはその一部；

b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び

d) AILIM に結合するポリペプチド。

- 86 -

16. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項10乃至請求項13のいずれかに記載の医薬組成物。

17. 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項16に記載の医薬組成物。

18. AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

19. 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項18に記載の医薬組成物。

20. 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項19に記載の医薬組成物。

21. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項18乃至請求項20のいずれかに記載の医薬組成物。

22. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項21に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

23. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項18乃至請求項20のいずれかに記載の医薬組成物。

- 87 -

24. 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項23に記載の医薬組成物。

25. AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、外来抗原または自己抗原により惹起される免疫反応を抑制するための医薬組成物。

26. 該免疫反応が、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、またはサイトカインの産生であることを特徴とする請求項25に記載の医薬組成物。

27. 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項25または請求項26に記載の医薬組成物。

28. 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項27に記載の医薬組成物。

29. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の医薬組成物。

30. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項29に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

31. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の医薬組成物。

- 8 8 -

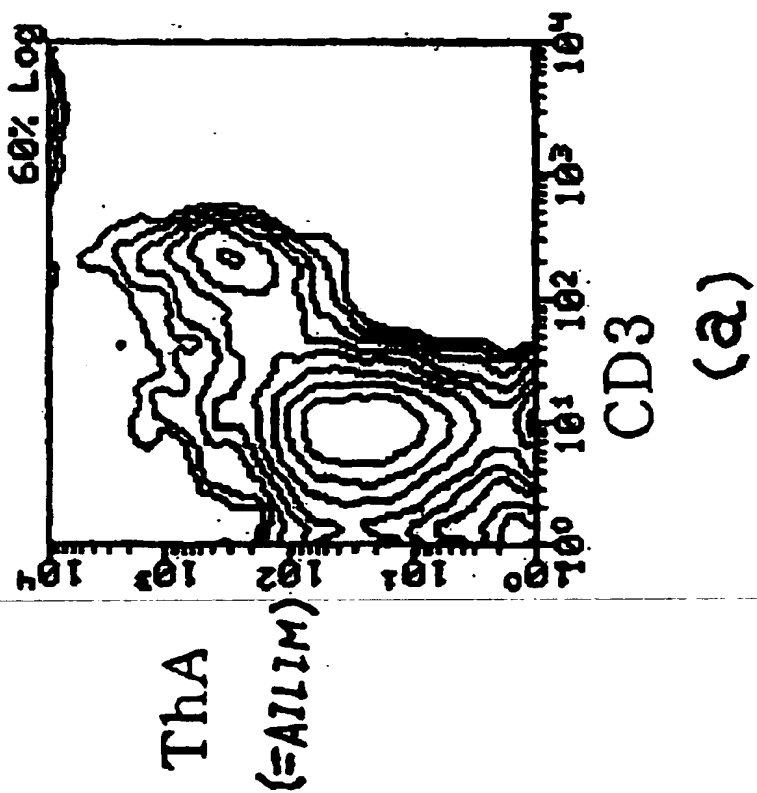
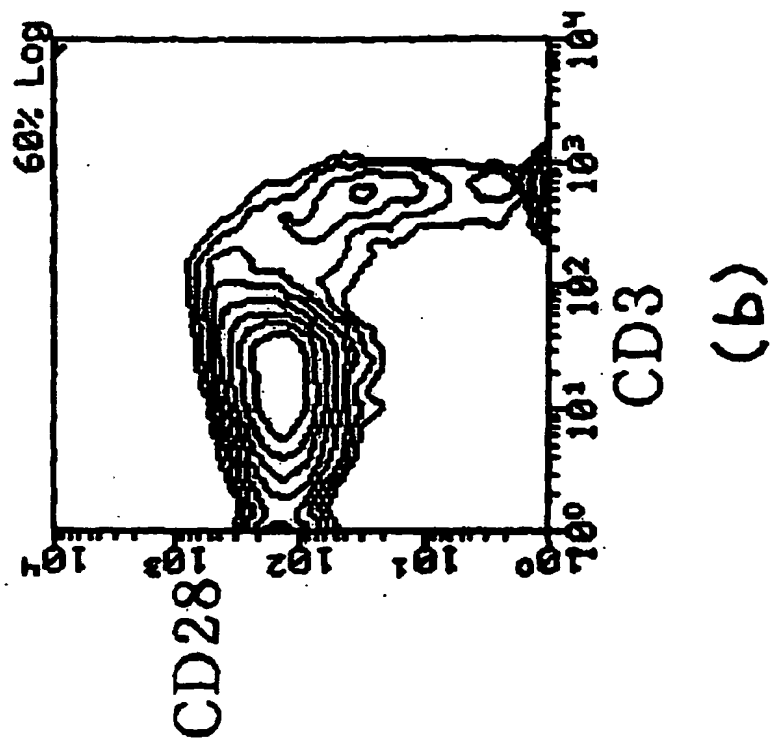
3 2 . 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項3 1に記載の医薬組成物。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



1 / 5 2

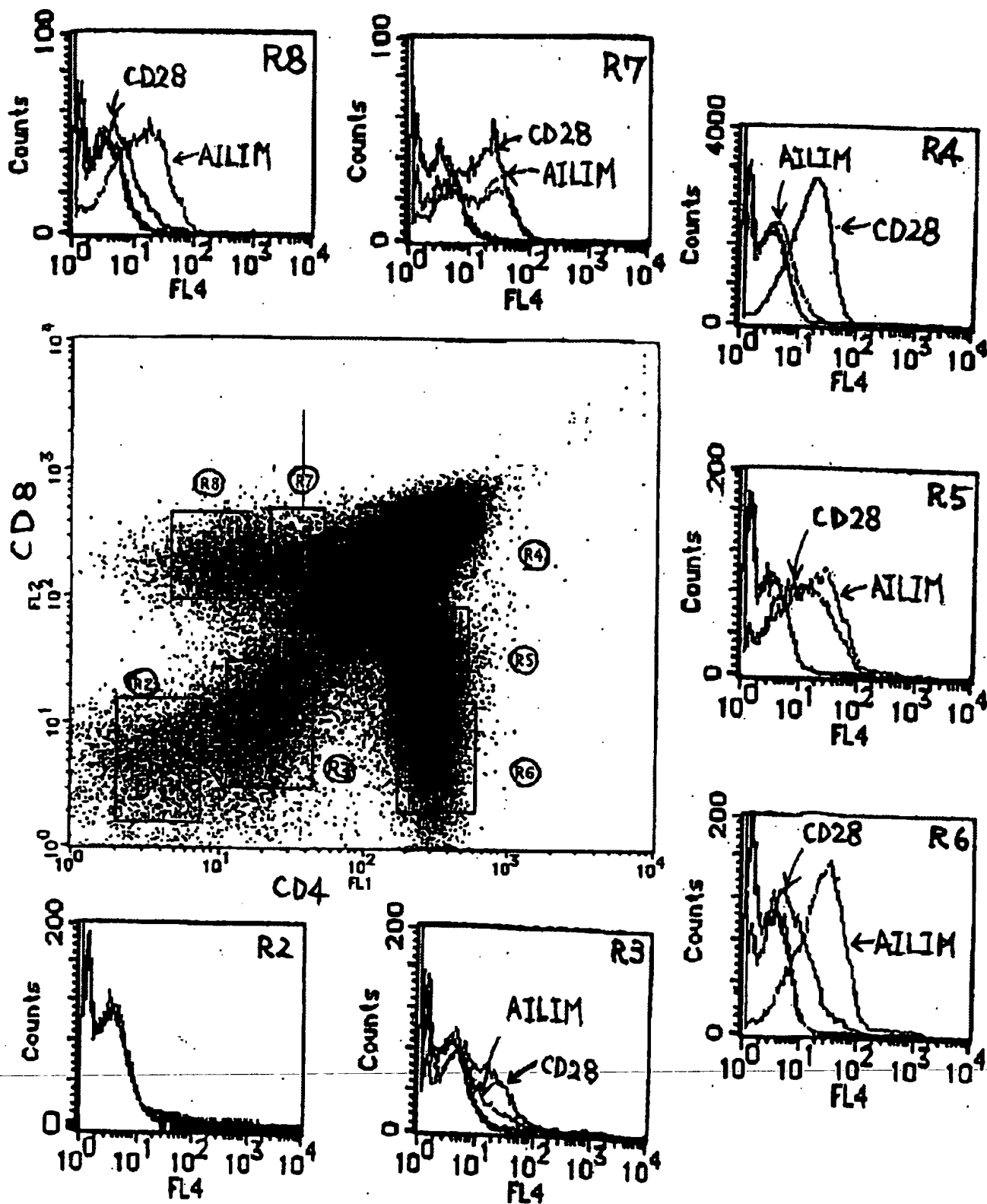
図 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2 / 5 2

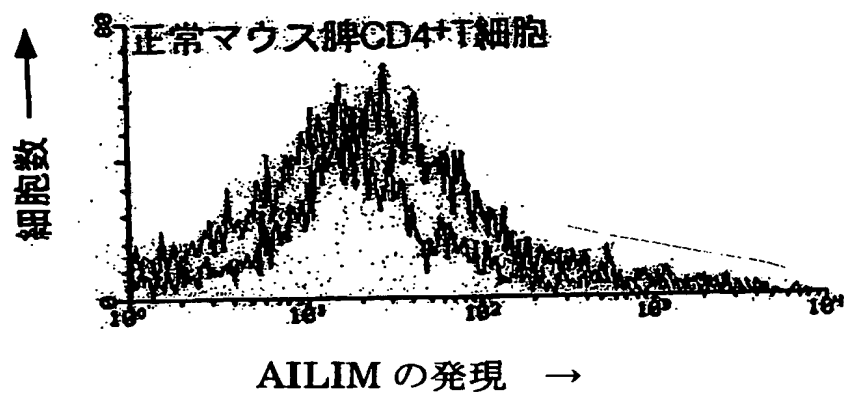
2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3 / 5 2

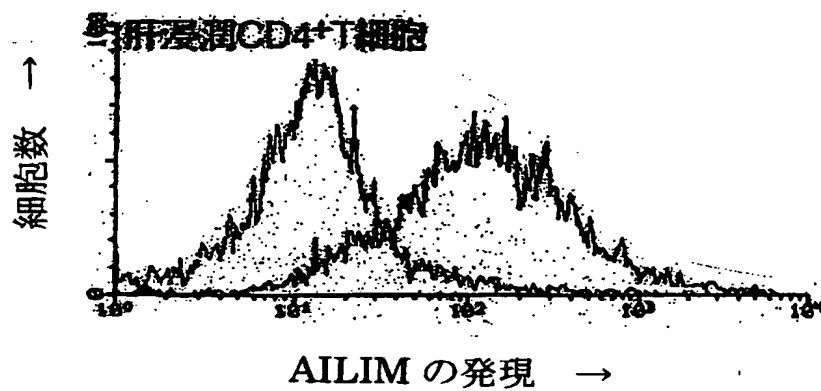
図 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4 / 5 2

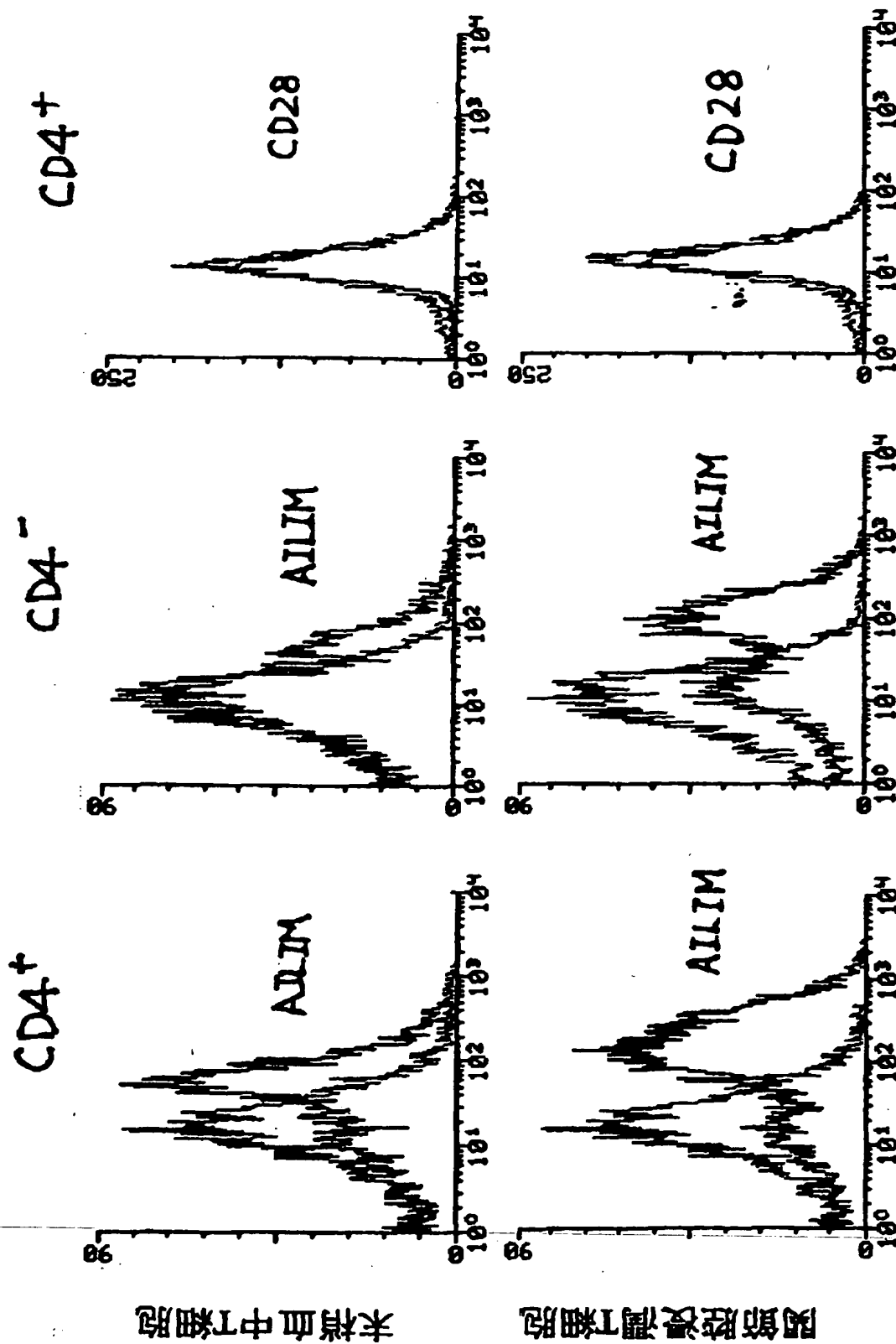
図 4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



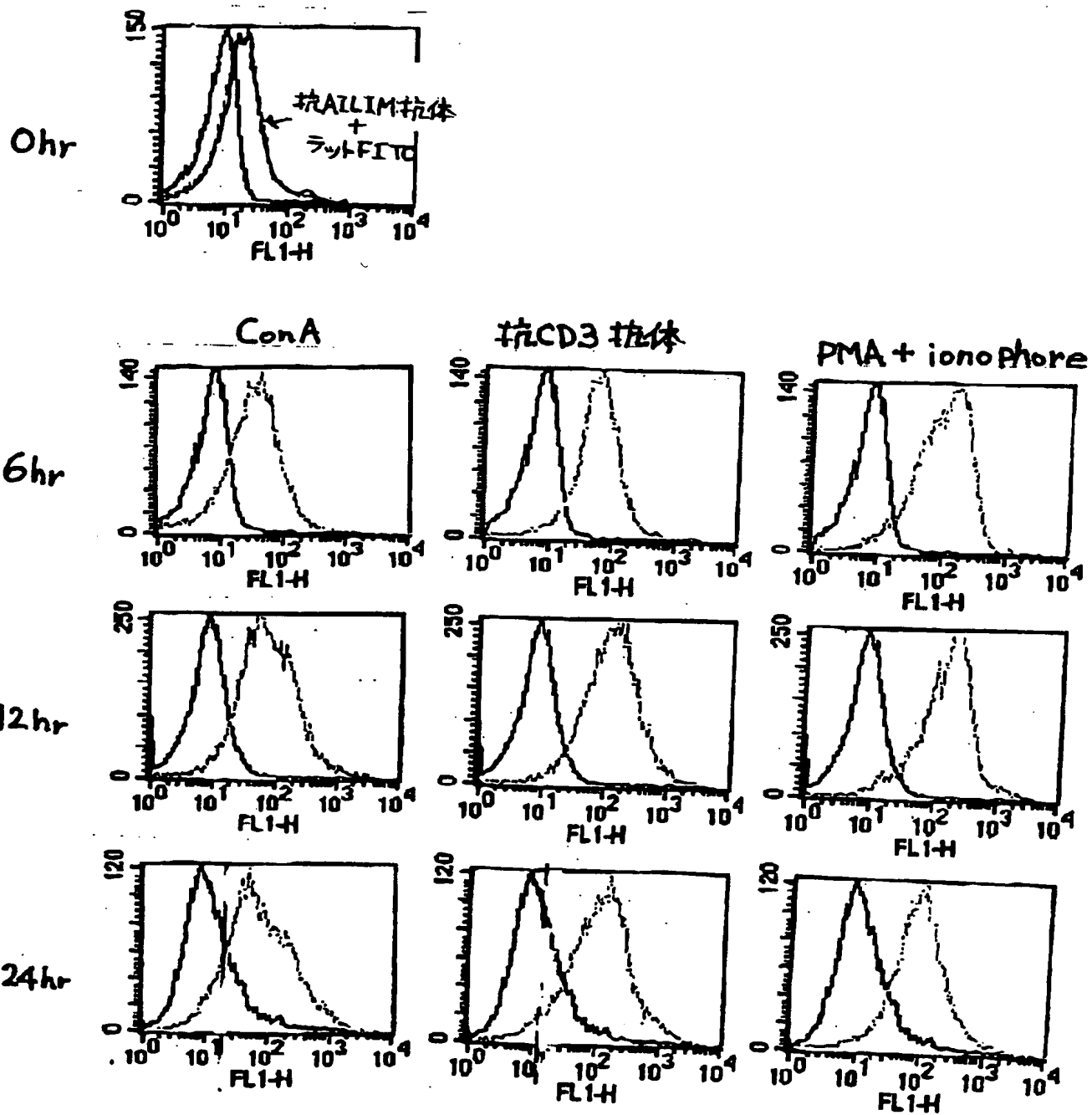
図 5





6 / 5 2

図 6



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7 / 5 2

図 7

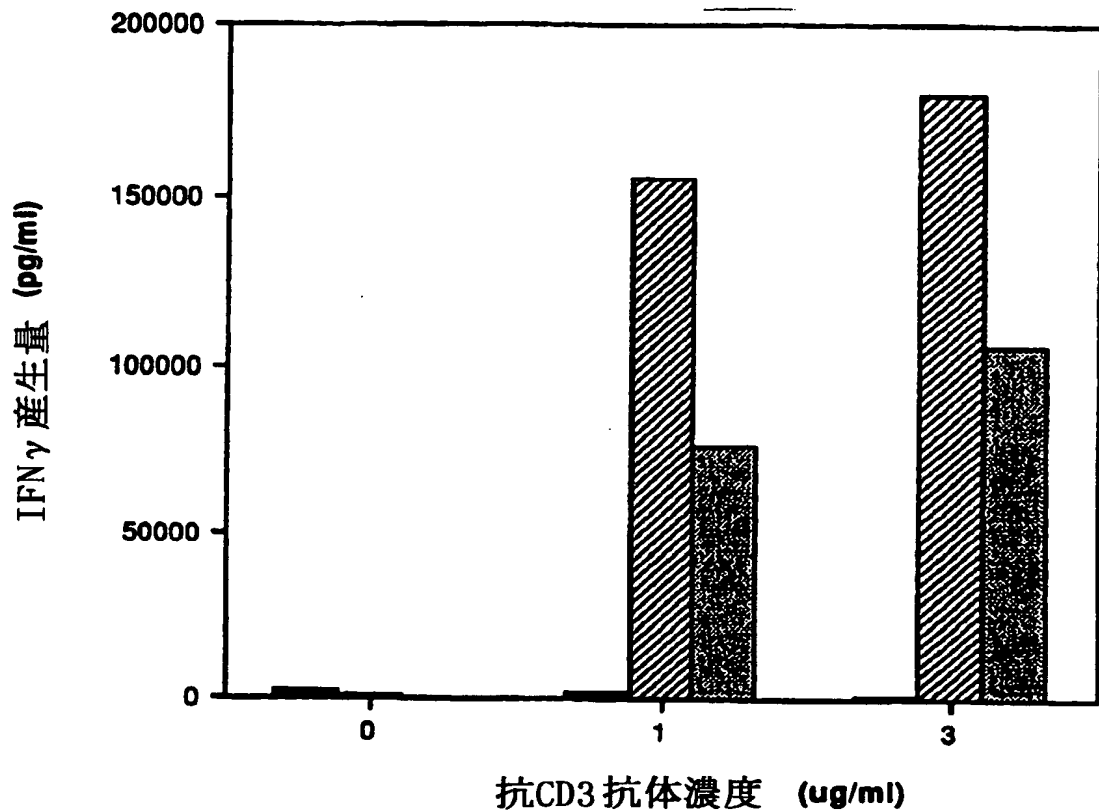
## 各種 T 細胞株の AILIM (マウス) の発現パターン

line	specificity	Lymphokine	Th1/Th2	CD28/AILIM
<b>1. T 細胞株</b>				
D10	Con-Albumin	IL-4	Th2	+/+
MS202	I-A <sup>k</sup>	IL-4	Th2	+/+
CD28KO	I-E <sup>k</sup>	IL-4	Th2	-/+
EL-4	?	IL-4/-2	Th0	+/+
2L2	Cytochrome C	IL-2/IFN- $\gamma$	Th1	+/+
BC3C13	Mls <sup>c</sup>	IFN- $\gamma$	Th1	+/+
<b>2. T ハイブリドーマ (BW5147 親株)</b>				
KV24	?	IL-2	Th1	+/+
DO.11.10	OVA	IL-2	Th1	+/+
8-4-31	SEB	IL-2	Th1	+/+
3H10-11	SEB	IL-2	Th1	+/+
61-21-25	SEB	IL-2	Th1	+/+
1-2-66	SEB	IL-2	Th1	+/+
6-13-64	SEB	IL-2	Th1	-/-

**THIS PAGE BLANK (USPIC)**

8 / 5 2

図 8



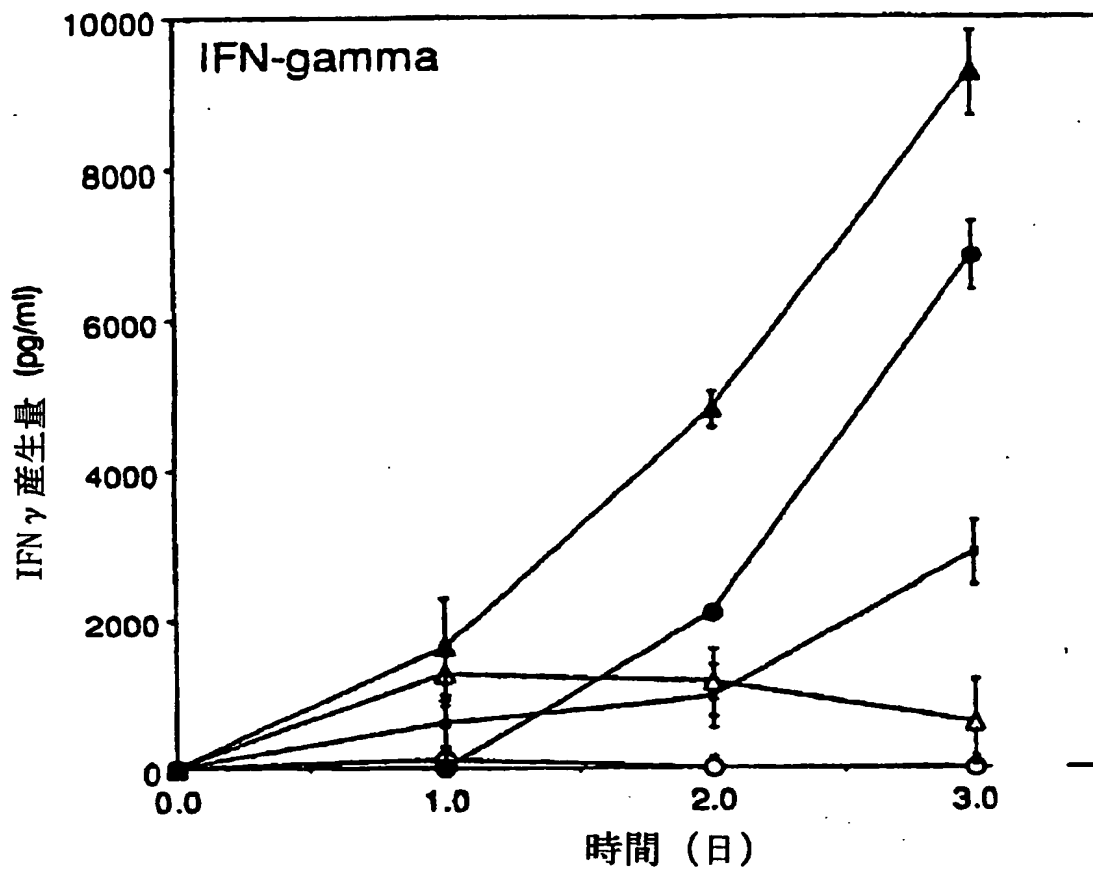
- 抗 CD3 抗体のみコーティング
- ▨ 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体をコーティング (day 3)
- ▩ 抗 CD3 抗体 + 抗マウス AILIM 抗体 (B10.5) をコーティング (day 3)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



9 / 52

図 9

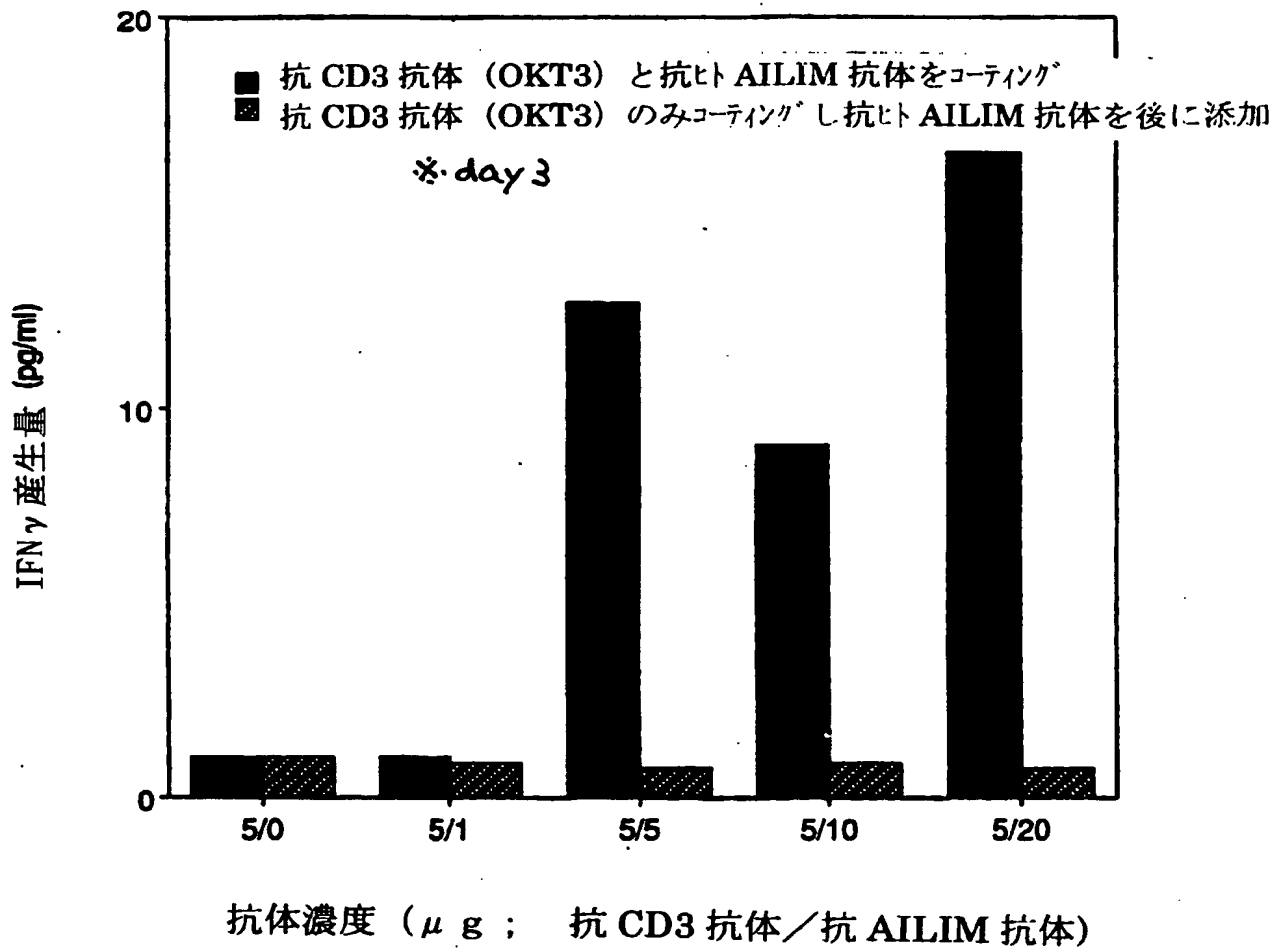


- ▲ 抗 CD3 抗体 + 抗ラット AILIM 抗体 (JTT-1 抗体) をコーティング
- 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体をコーティング
- × 抗 CD3 抗体のみコーティング
- △ 抗ラット AILIM 抗体 (JTT-1 抗体) のみコーティング
- 抗 CD28 抗体のみコーティング

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/52

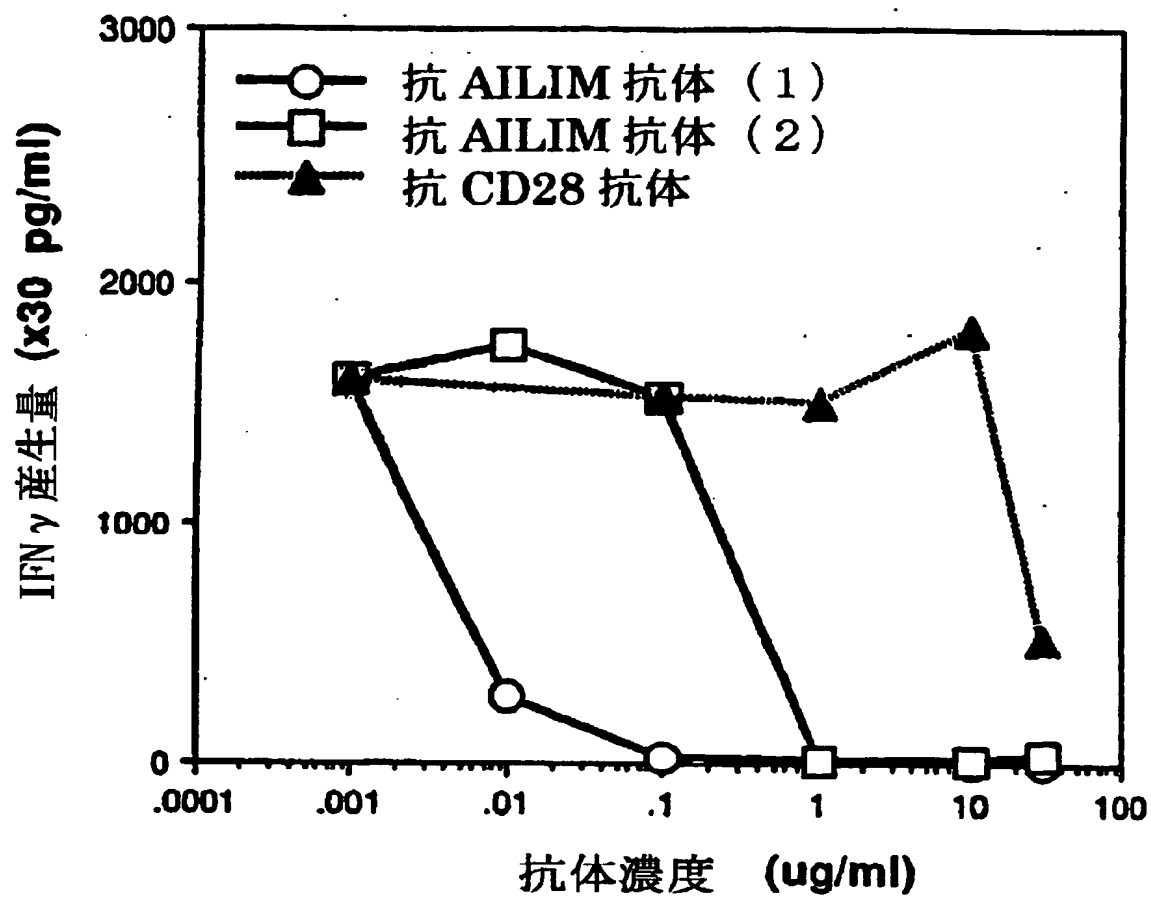
図 10



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/52

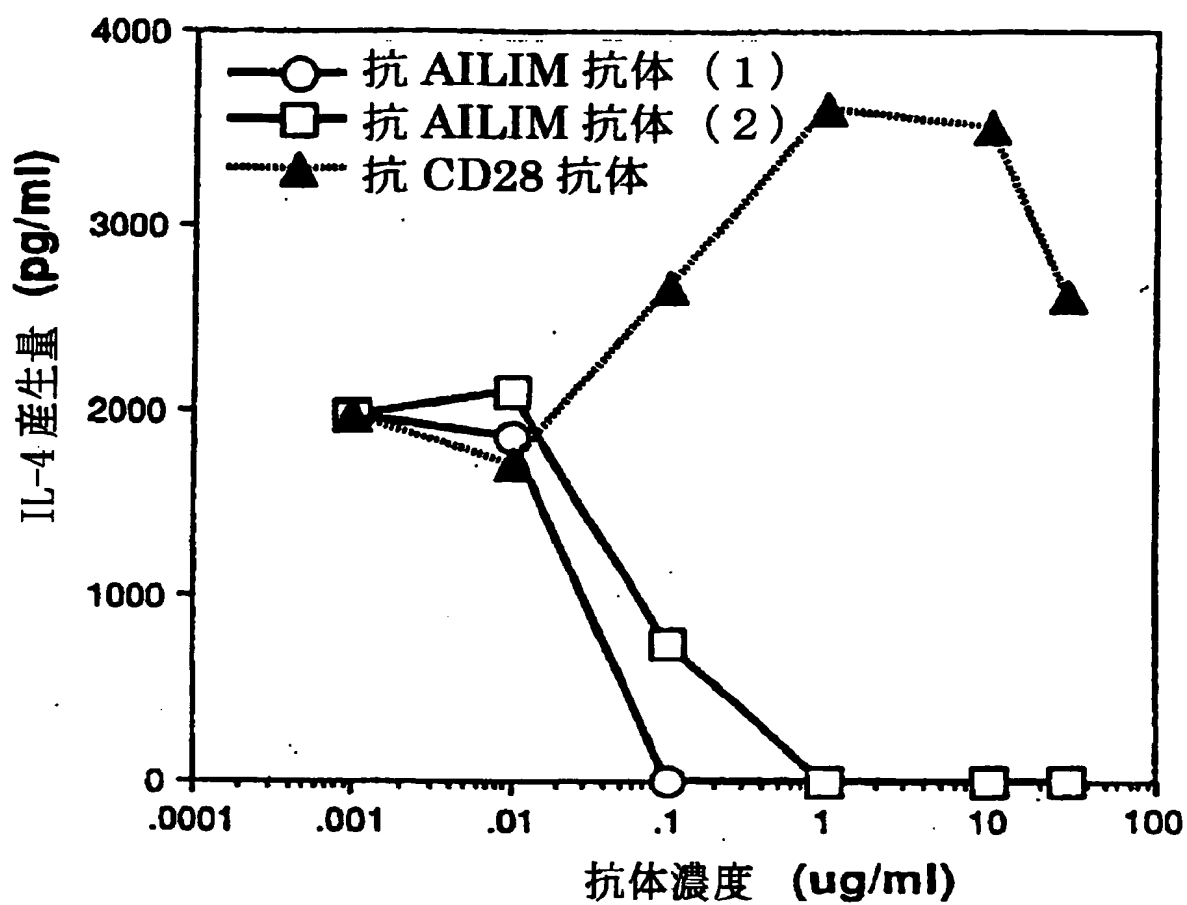
図 1 1



THIS PAGE BLANK (USE)

12/52

図 1 2



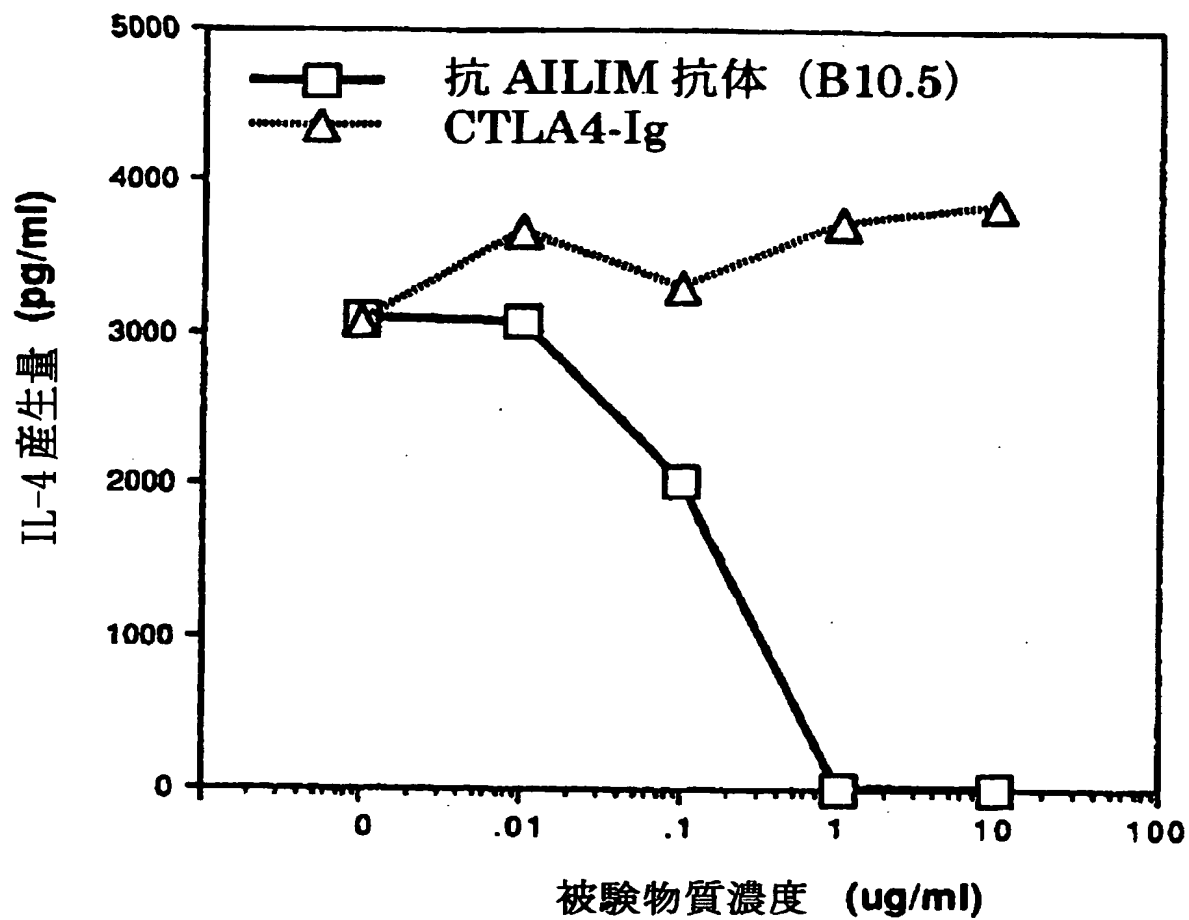
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



13/52

図 13

## 胸腺細胞

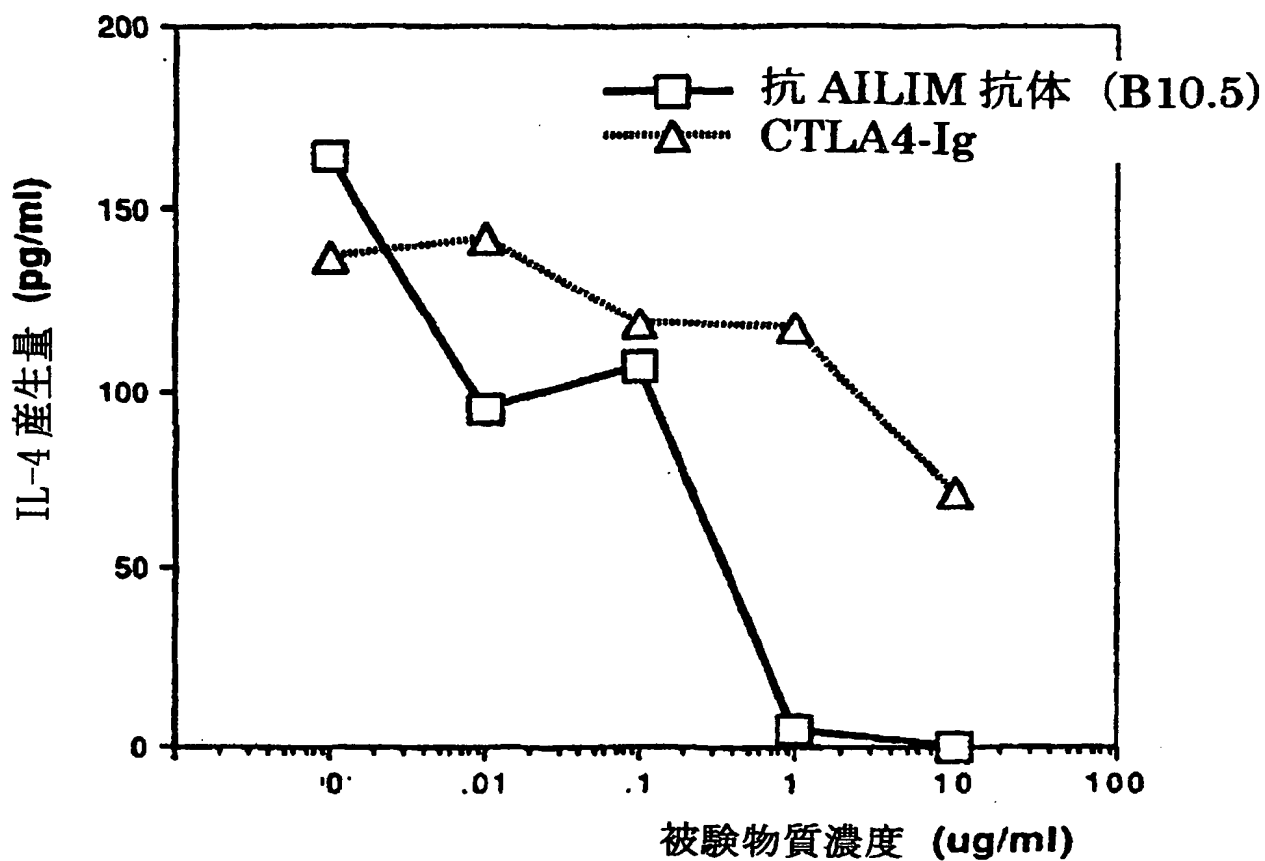


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14/52

図 14

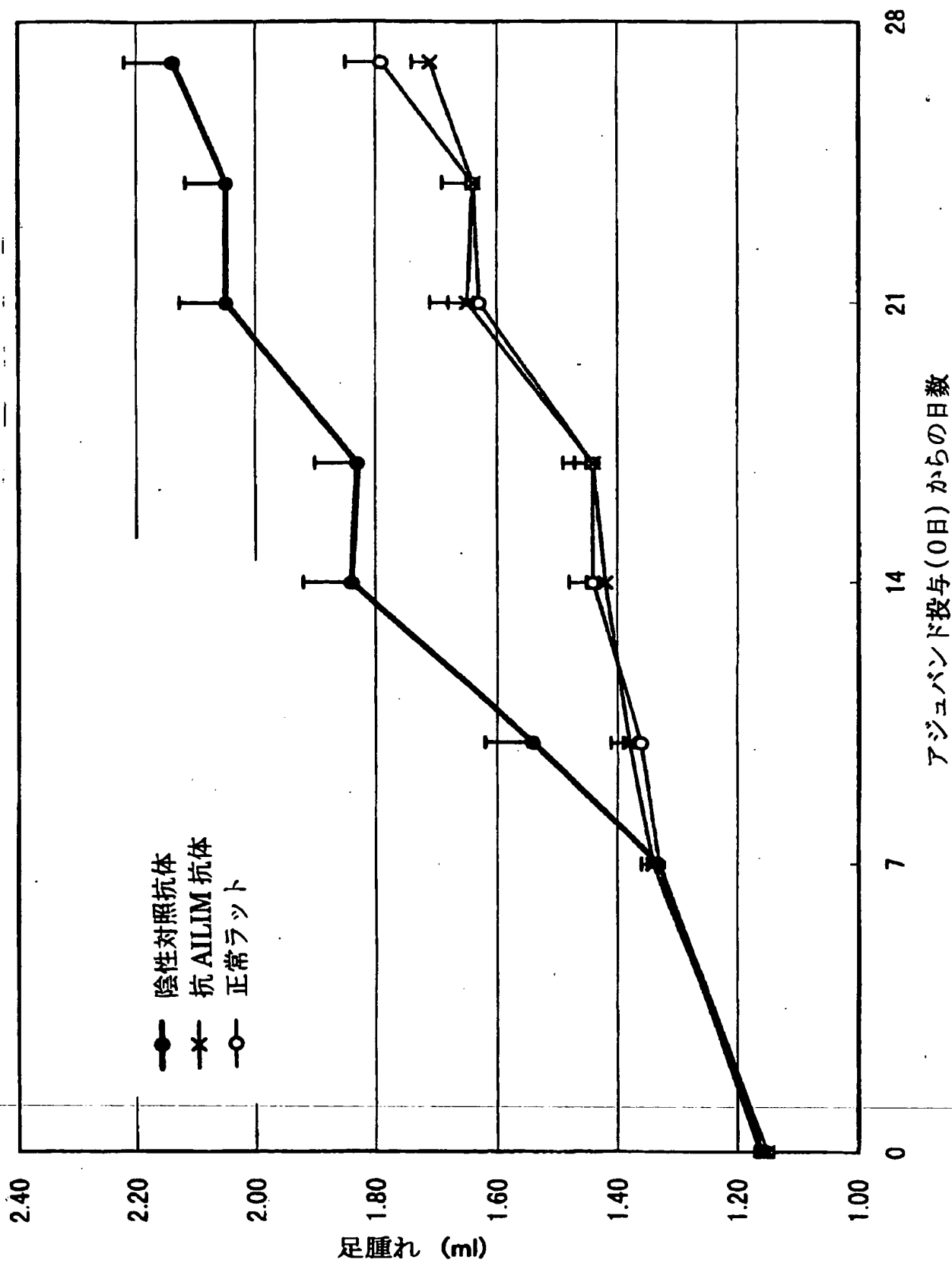
## 脾臓細胞



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

15/52

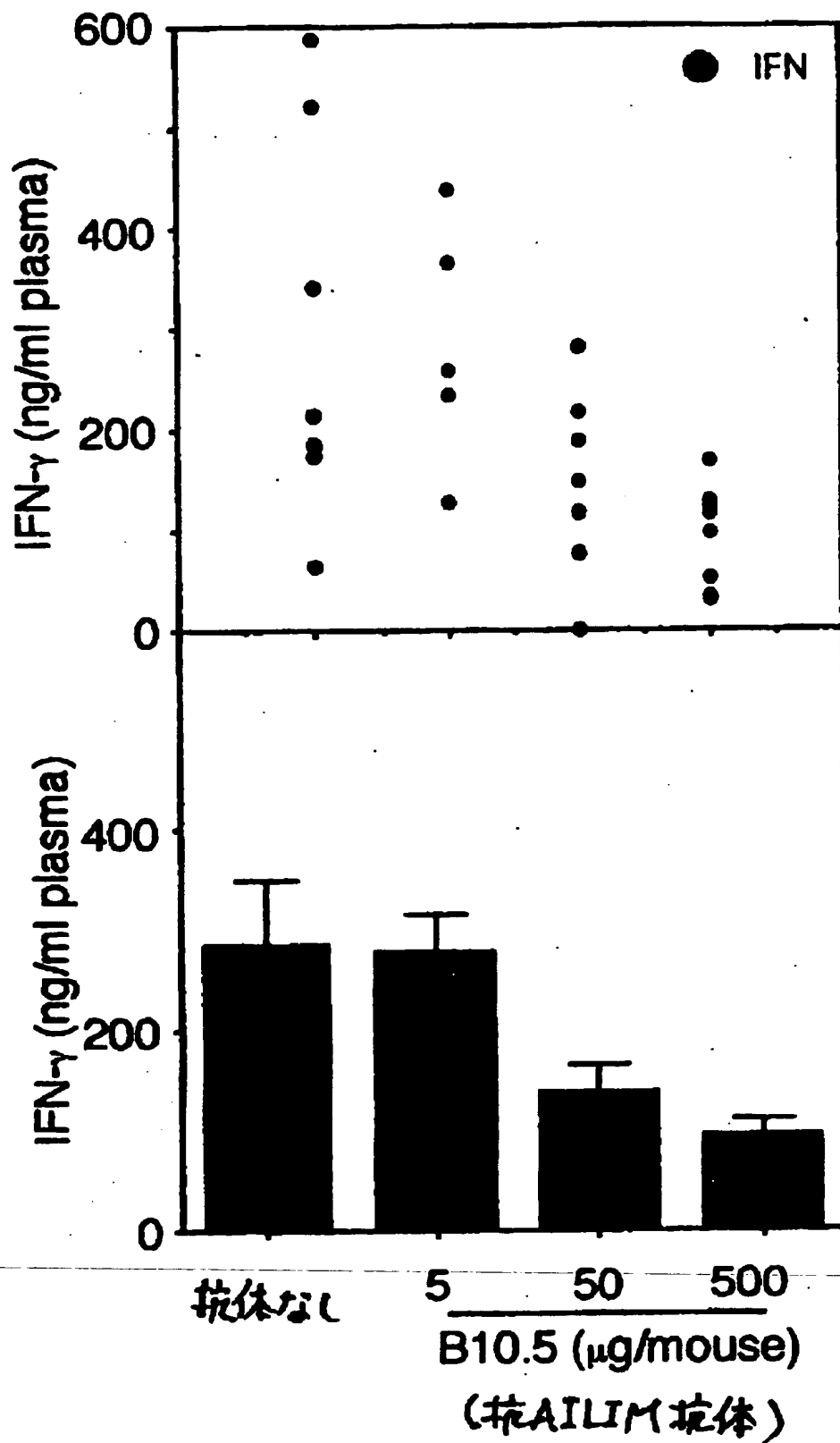
図 15



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

16/52

図 16

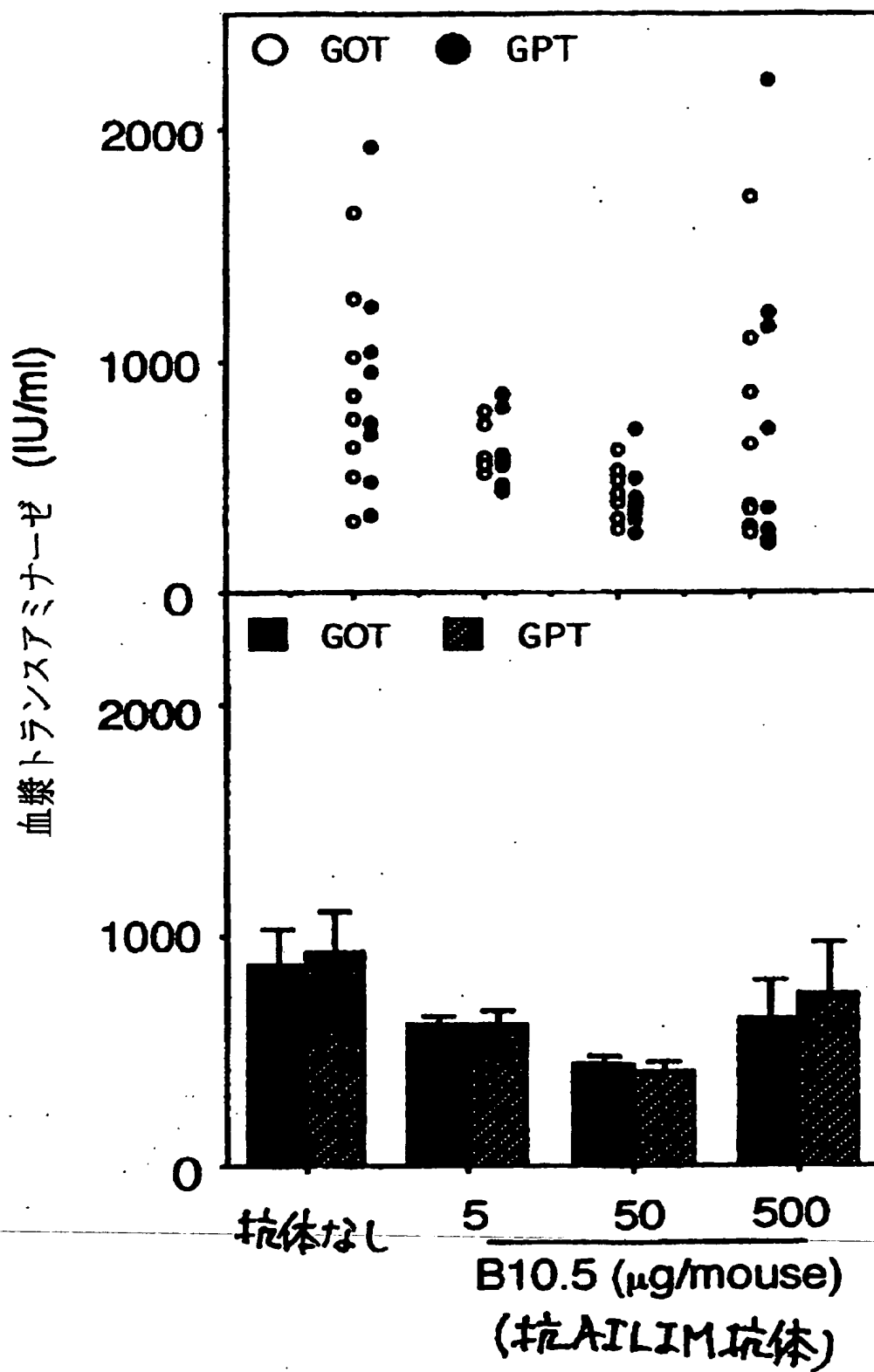


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



17/52

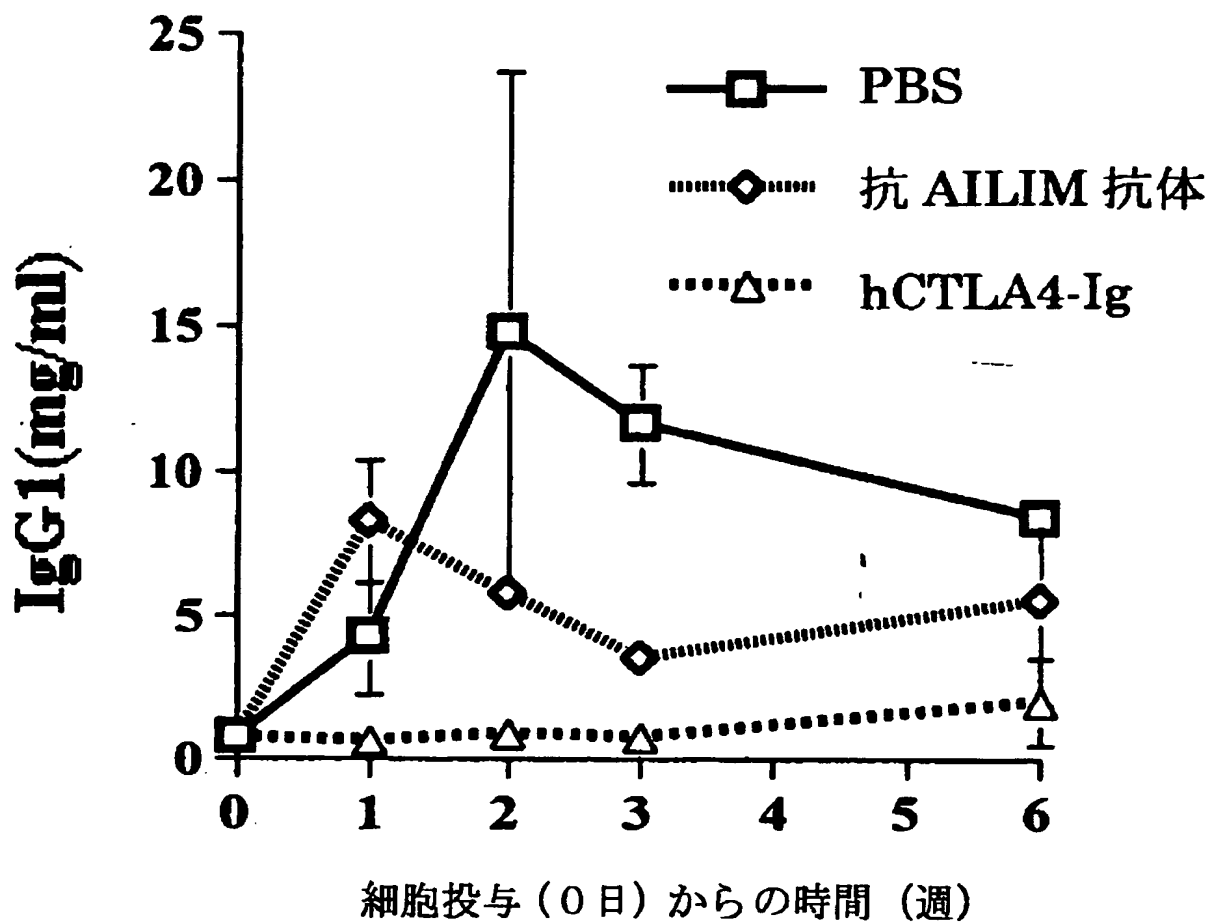
図 17



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

18 / 52

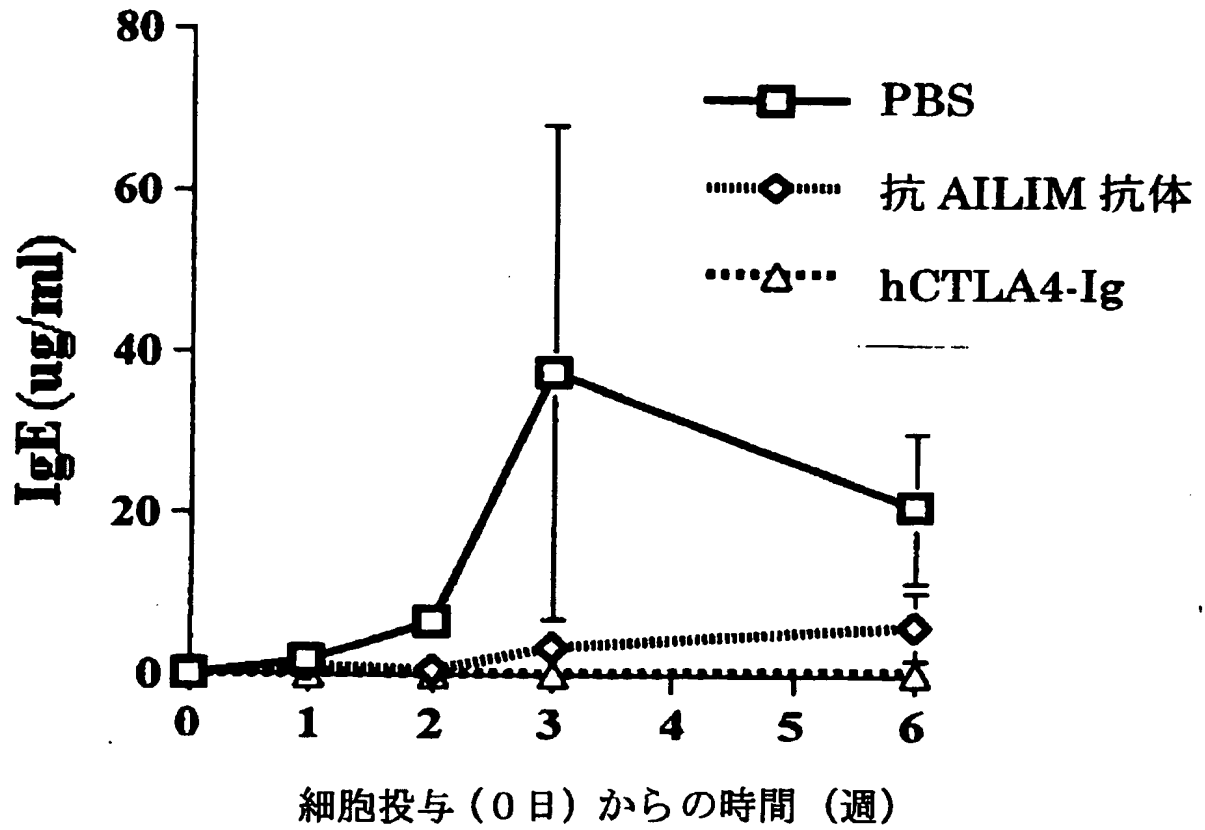
図 18



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

19/52

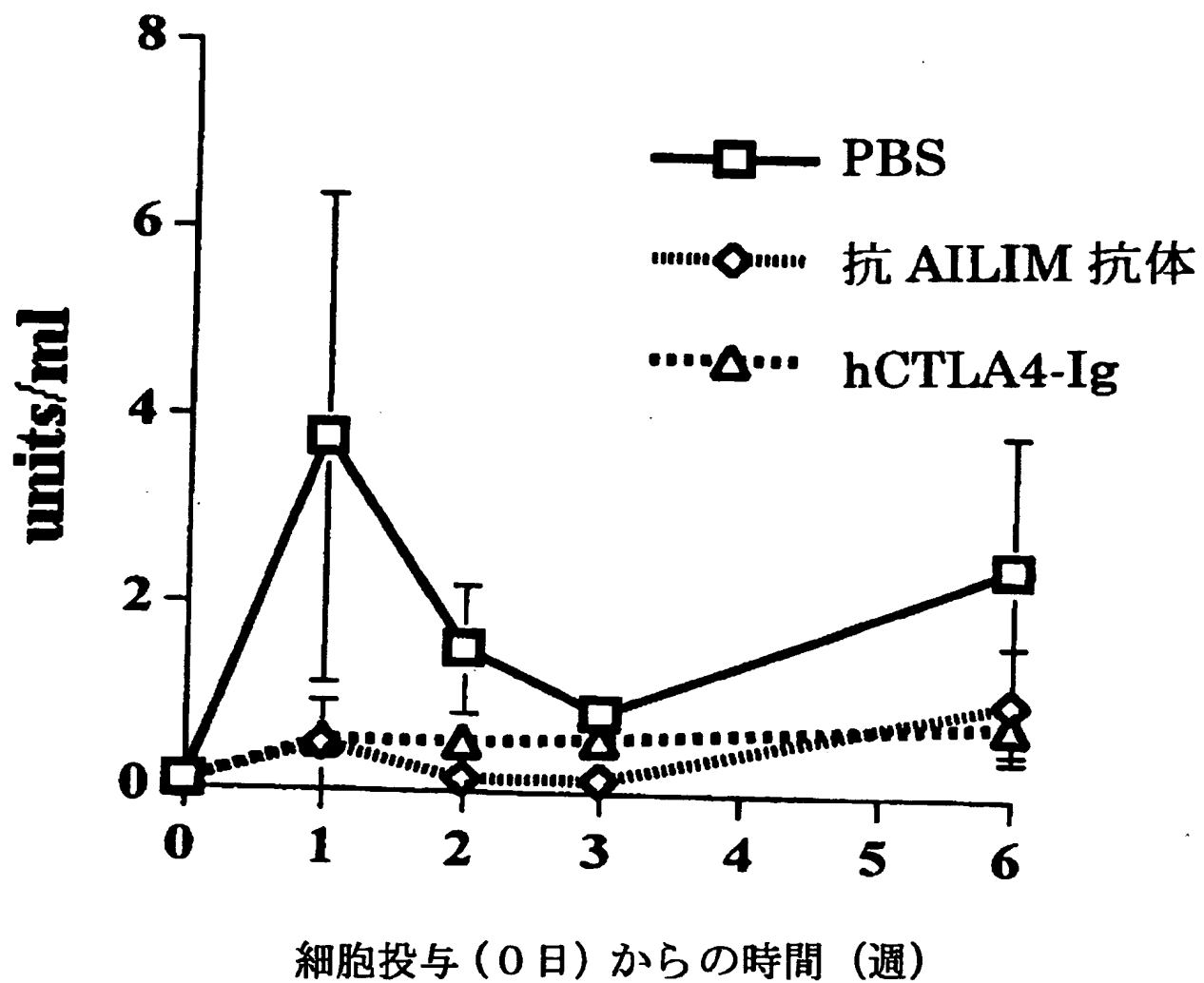
図 19



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

20/52

図 20

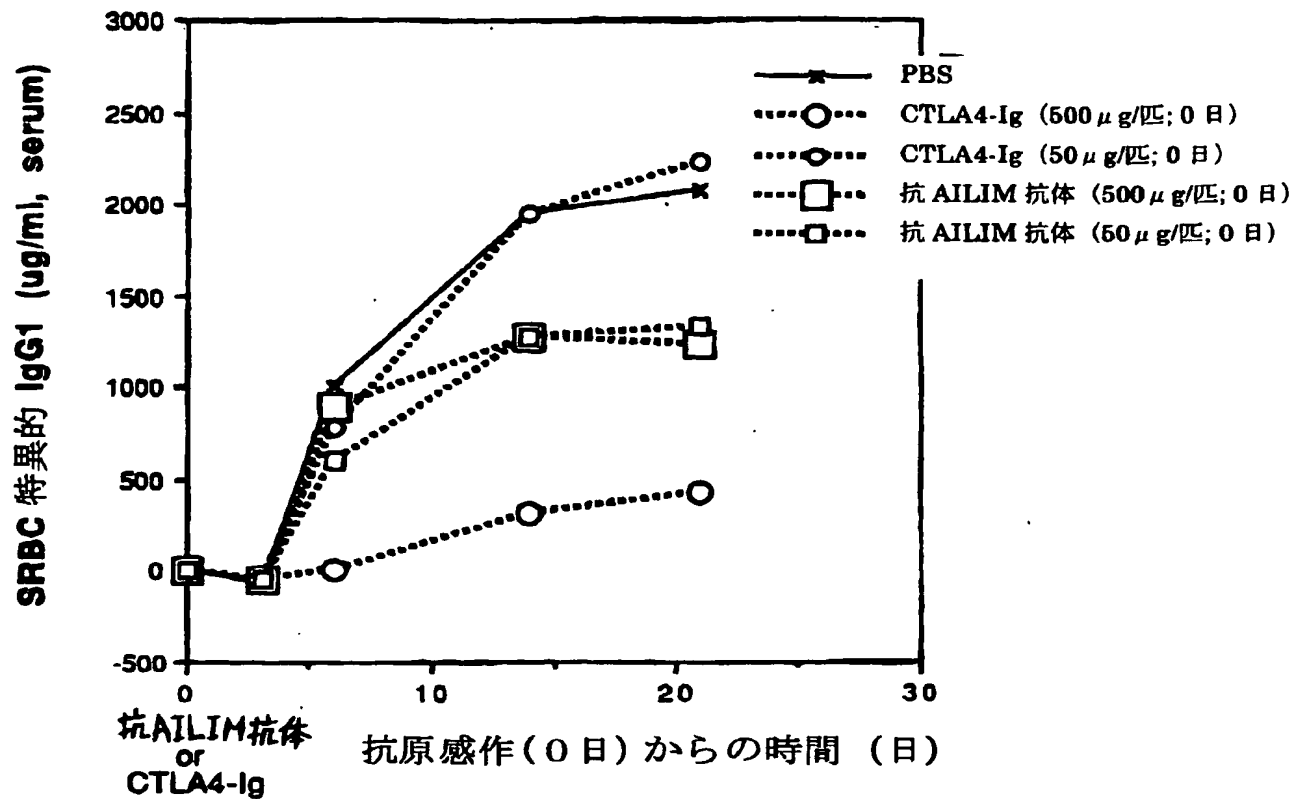


THIS PAGE BLANK (US)



21/52

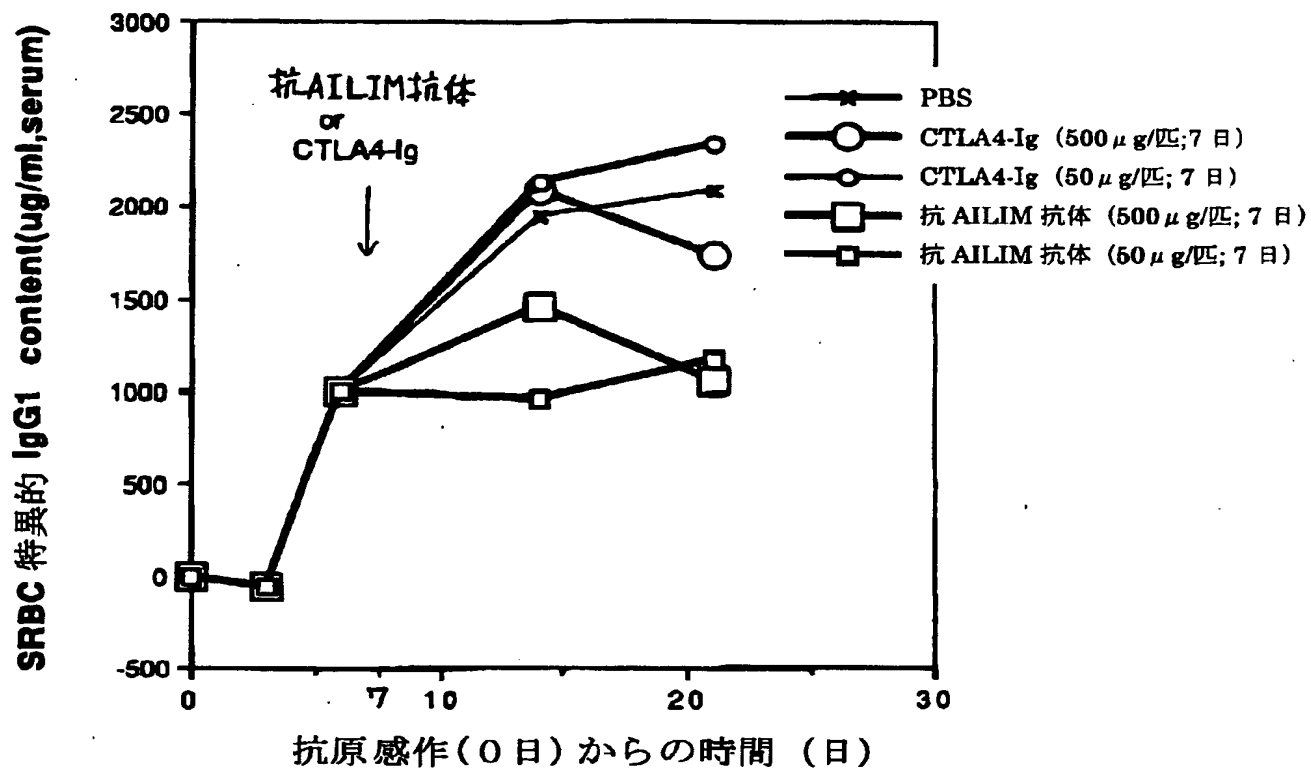
図 2 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

22/52

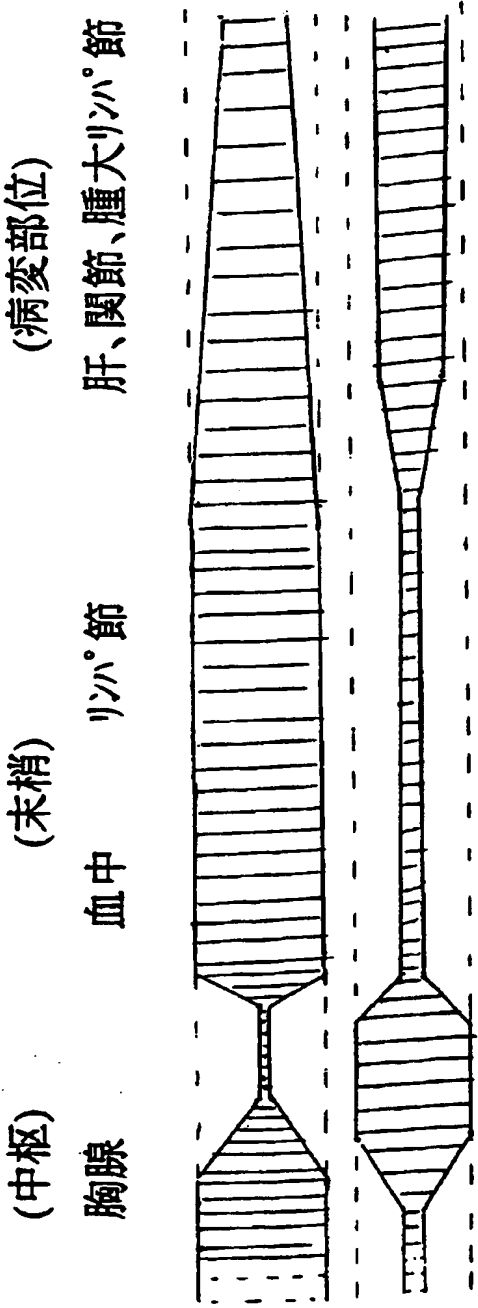
図 22



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

23/52

図 23



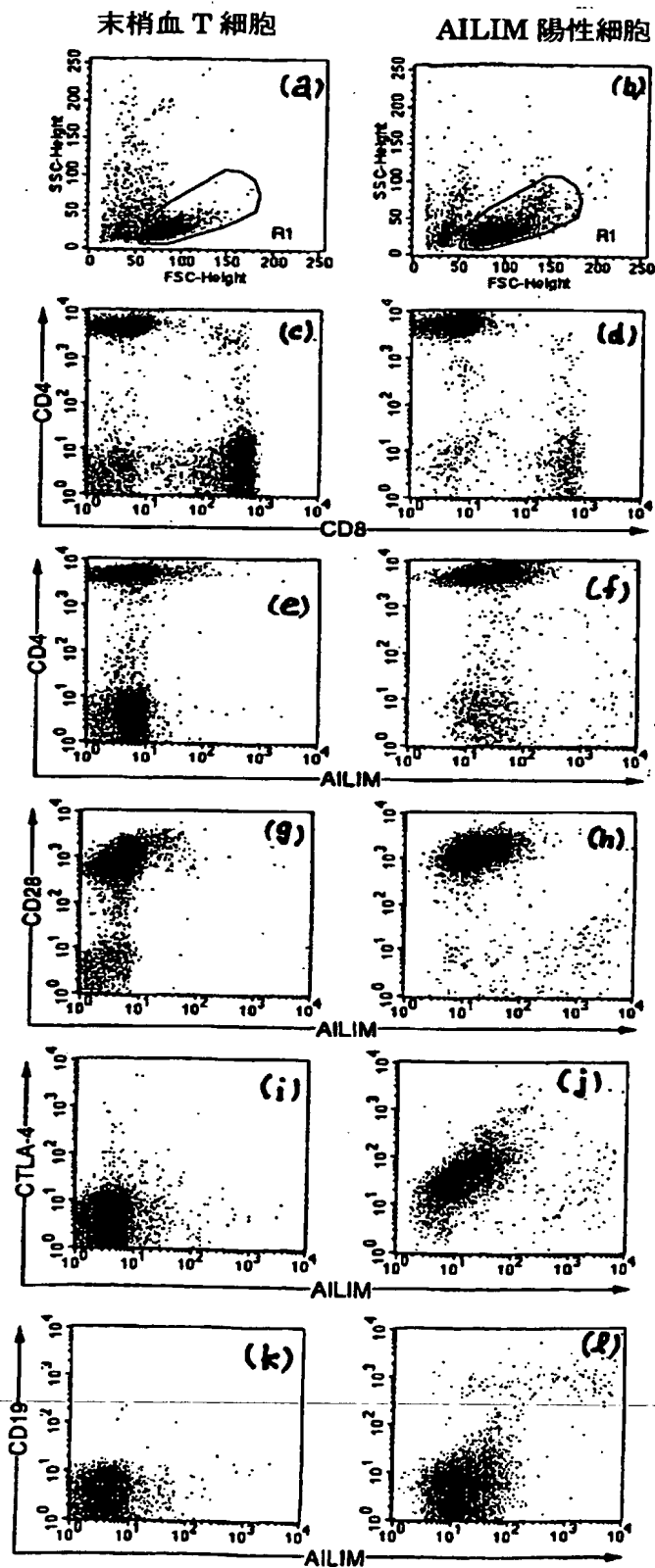
CD28

ALLIM  
(ICOS)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

24 / 52

図 24

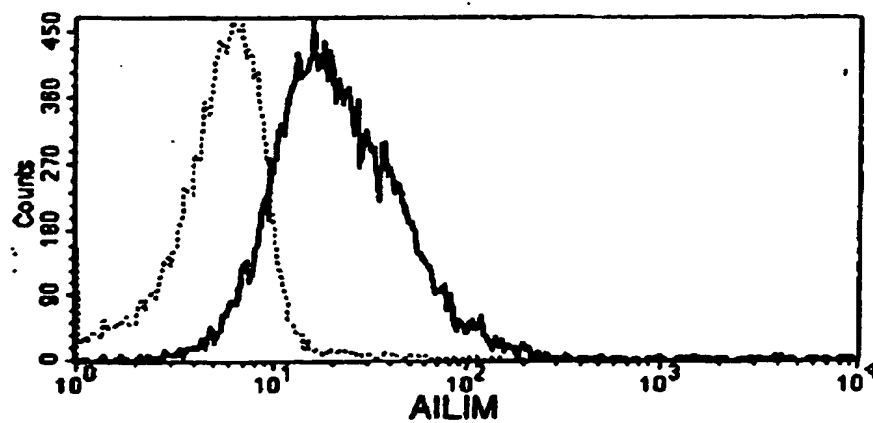


THIS PAGE BLANK (USE)

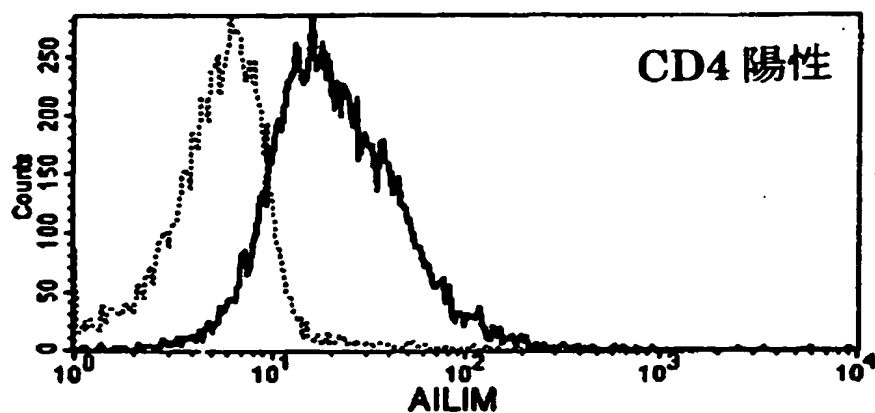


25 / 52

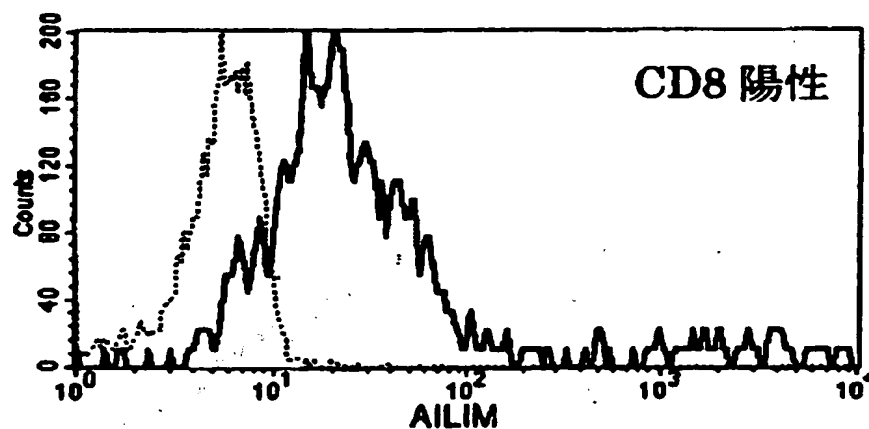
図 25



(a)



(b)



(c)

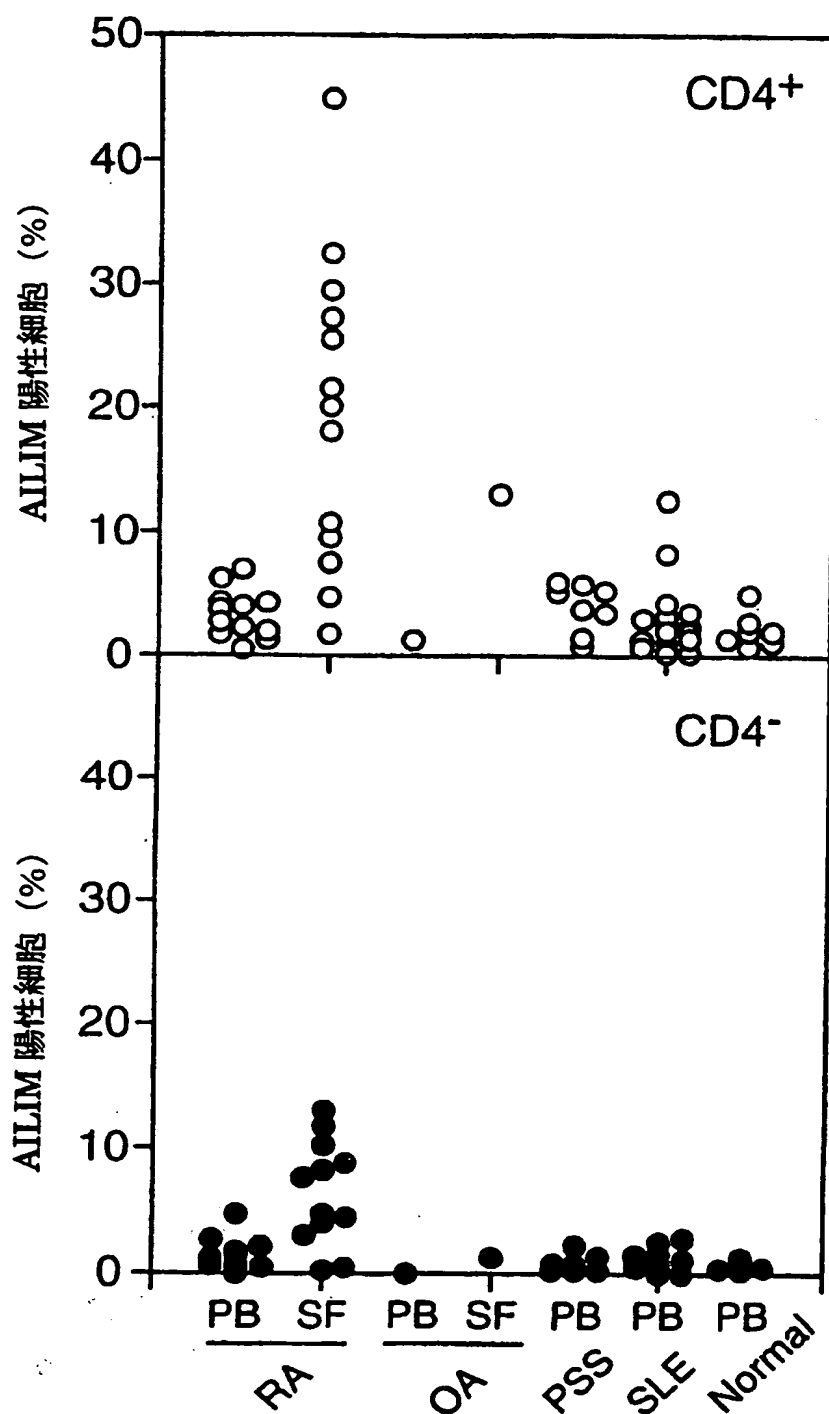
— AILIM 陽性細胞

..... 末梢血 T 細胞

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

26 / 52

図 26



PB : 末梢血 T 細胞

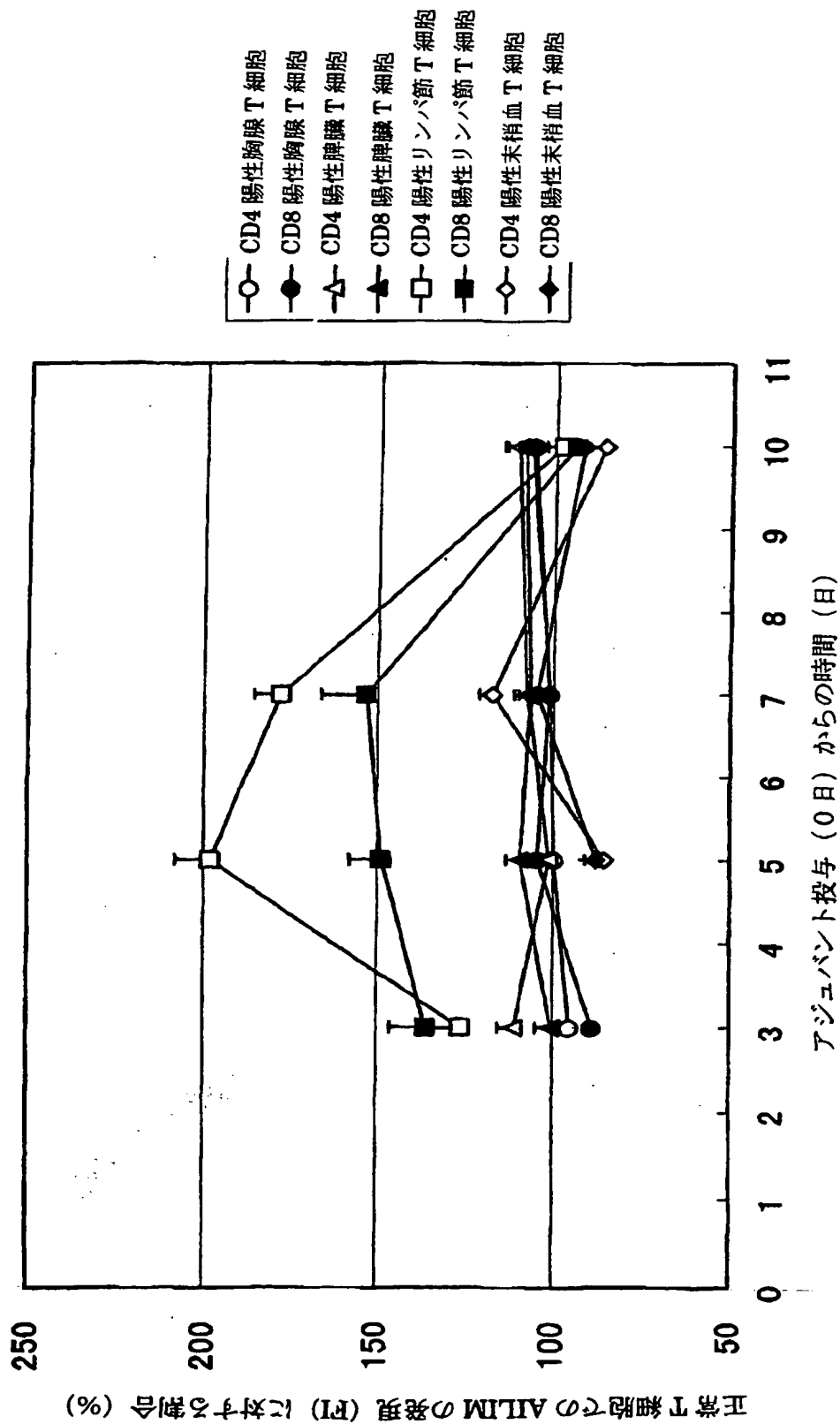
SF : 関節腔液由来 T 細胞

差替え用紙 (規則26)

THIS PAGE BLANK (USE)

27 / 52

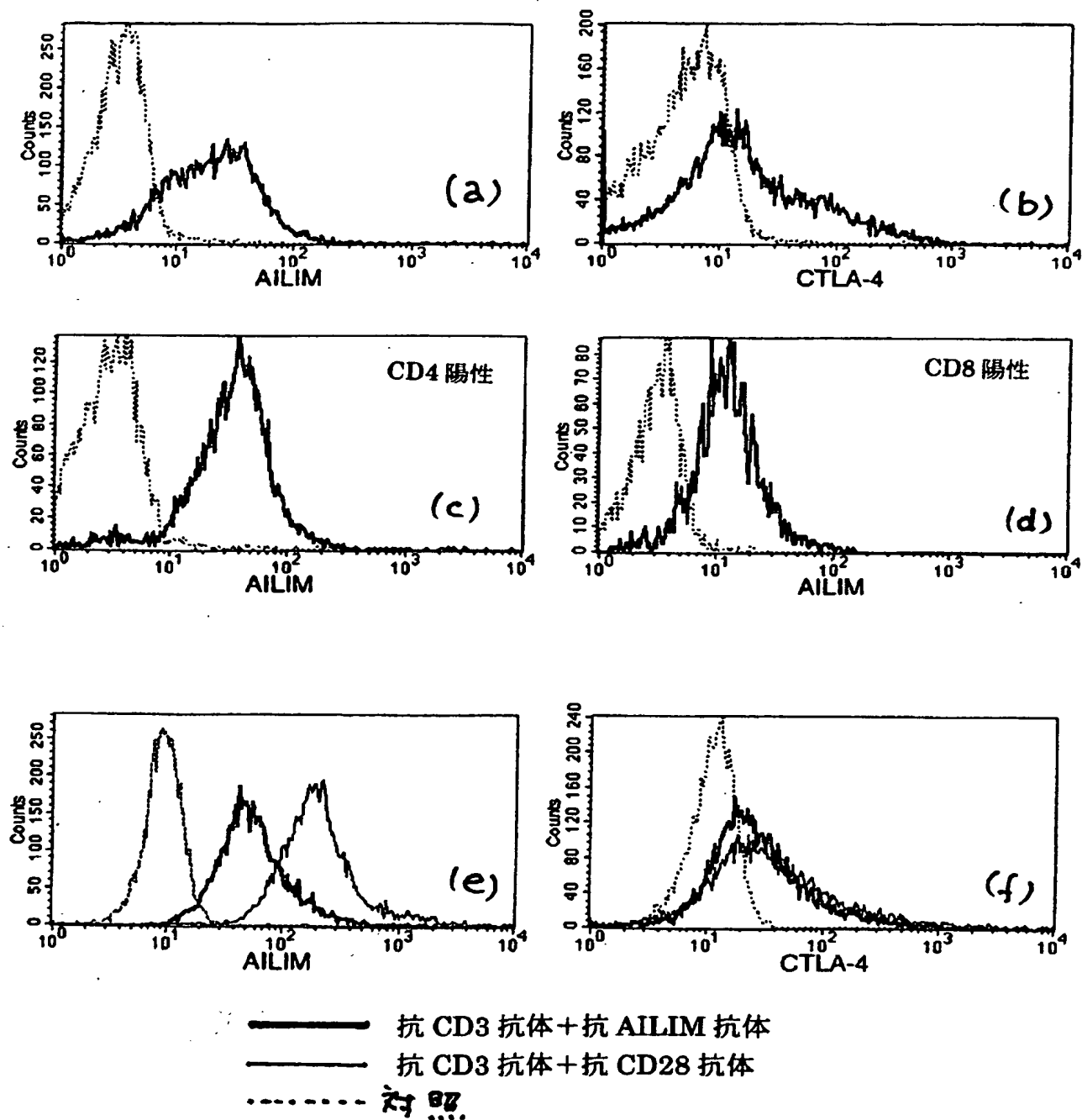
図 27



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

28 / 52

図 28

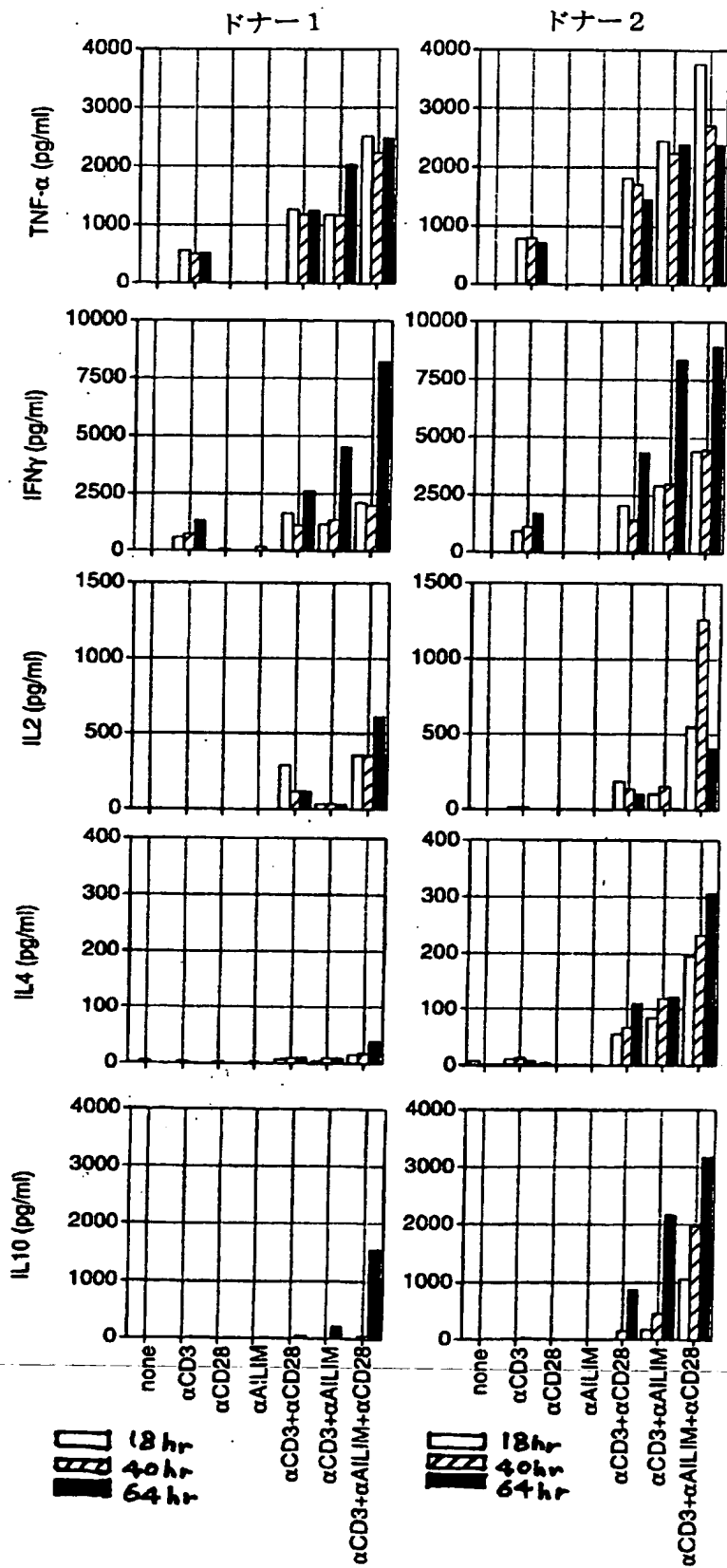


THIS PAGE BLANK



29 / 52

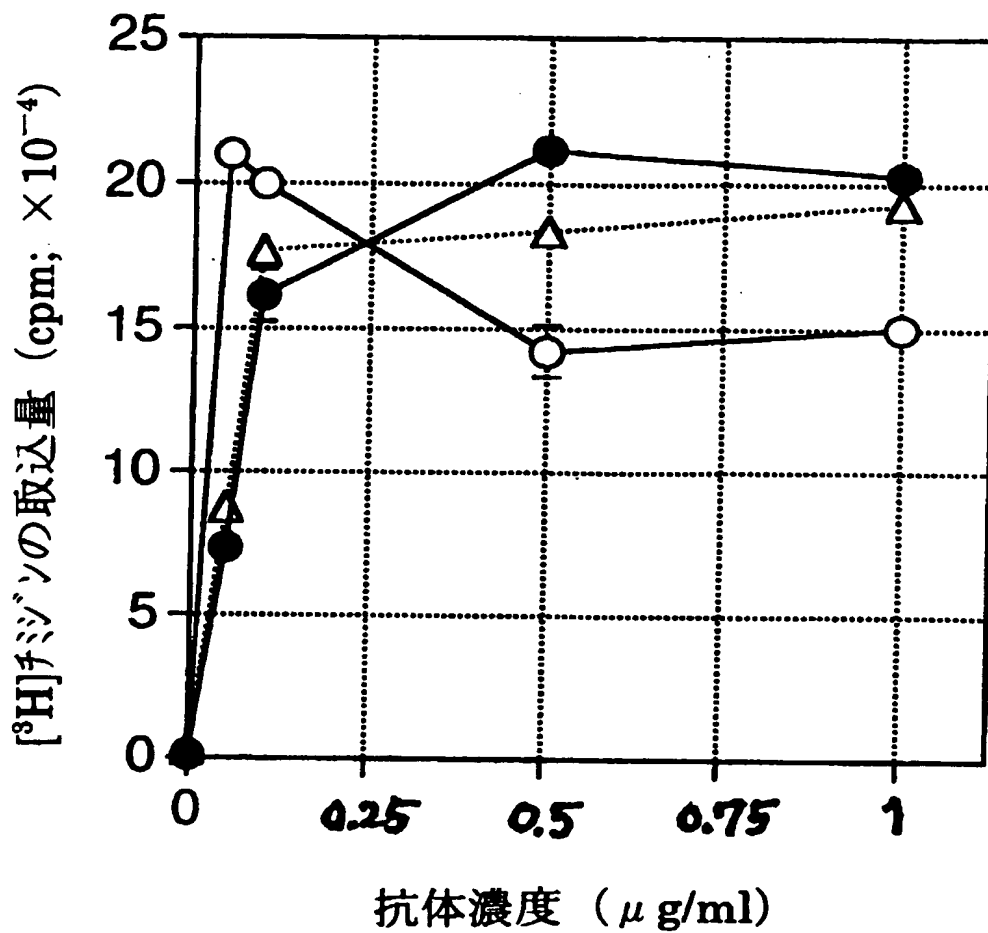
図 29



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

30/52

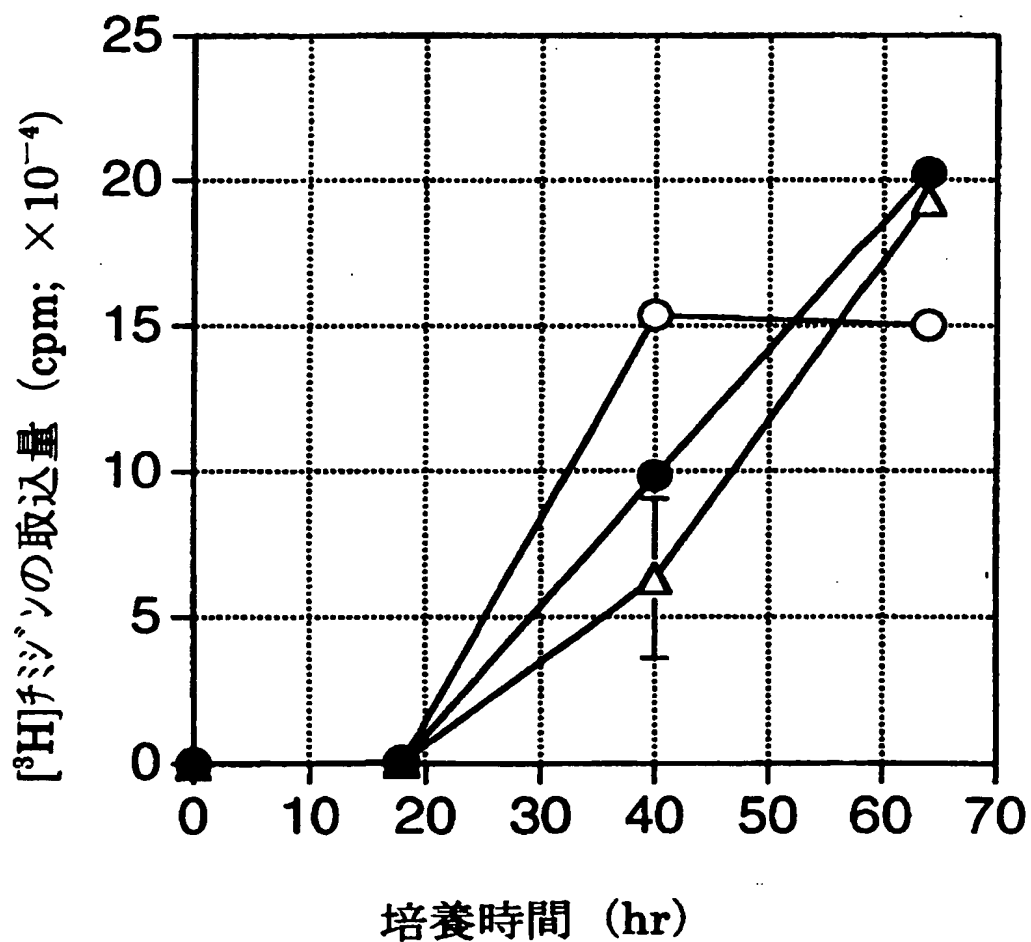
図 30



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

31/52

図 3 1

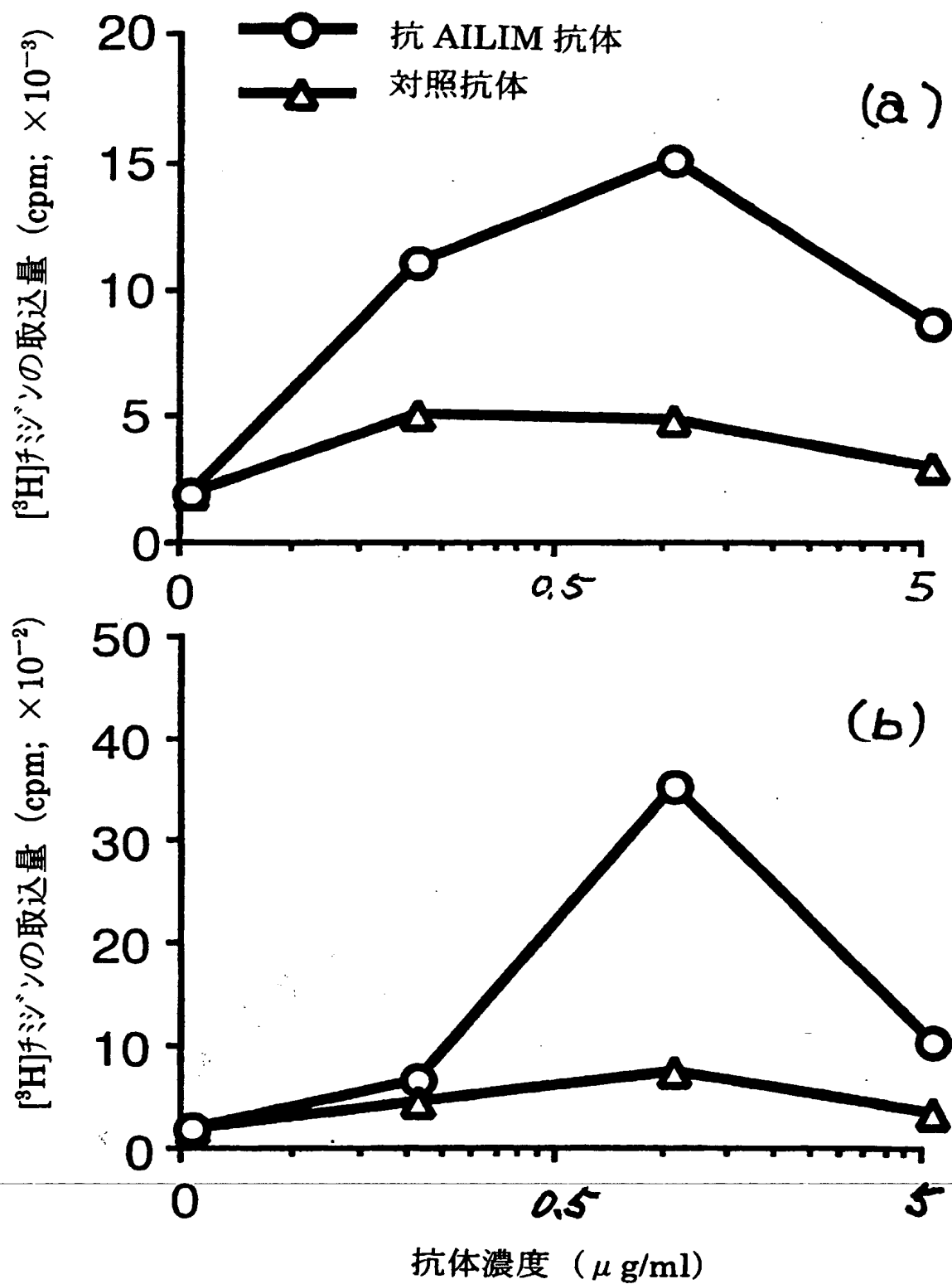


- 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体  
● 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体  
△ 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体 + 抗 CD28 抗体

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

32/52

図 3 2

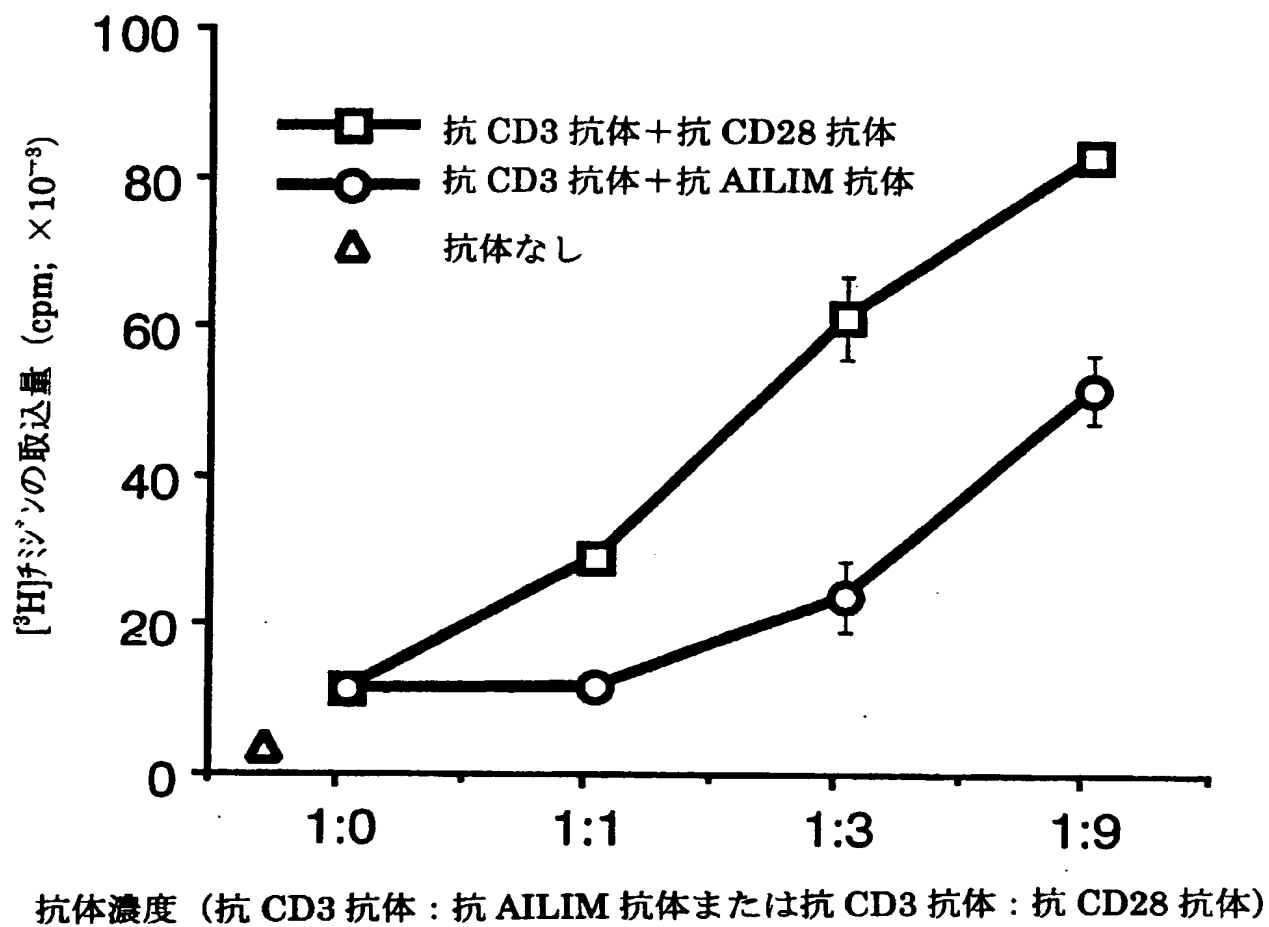


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



33/52

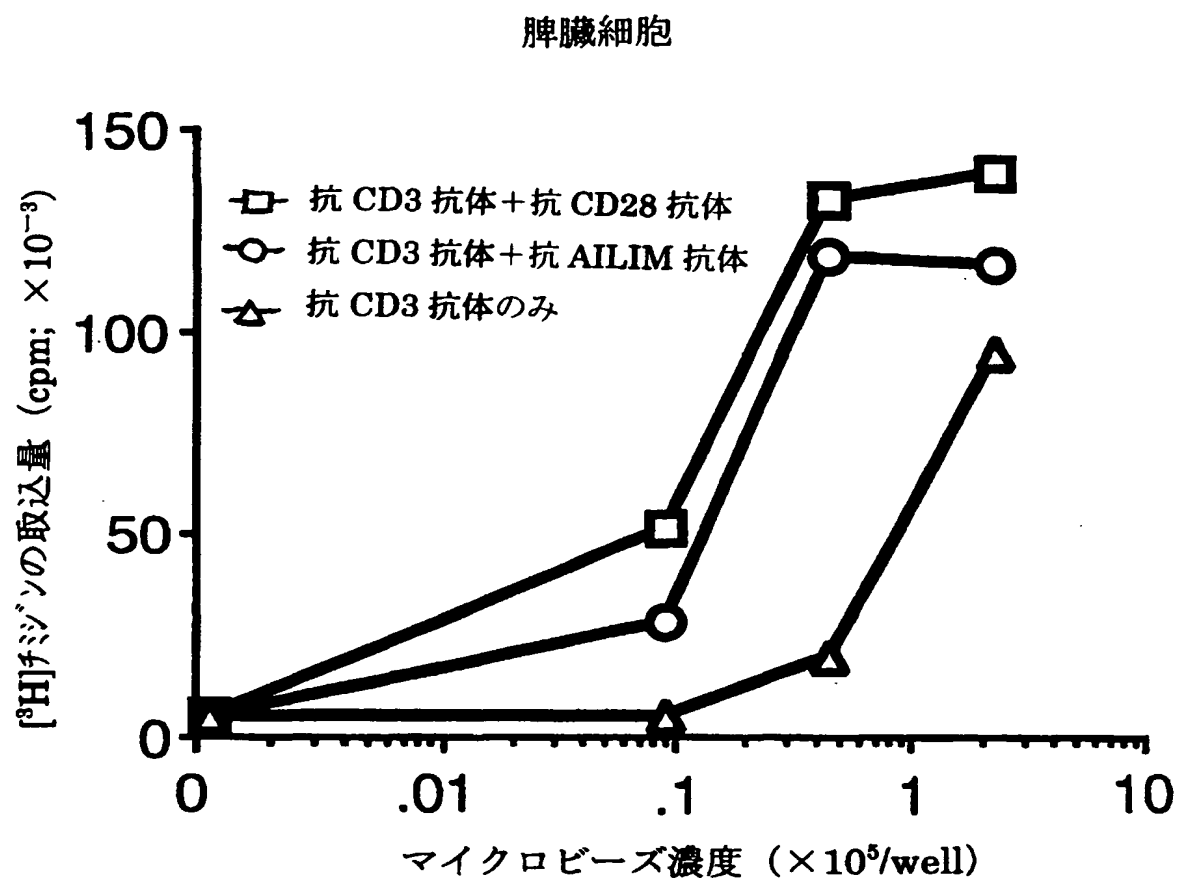
図 3 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

34/52

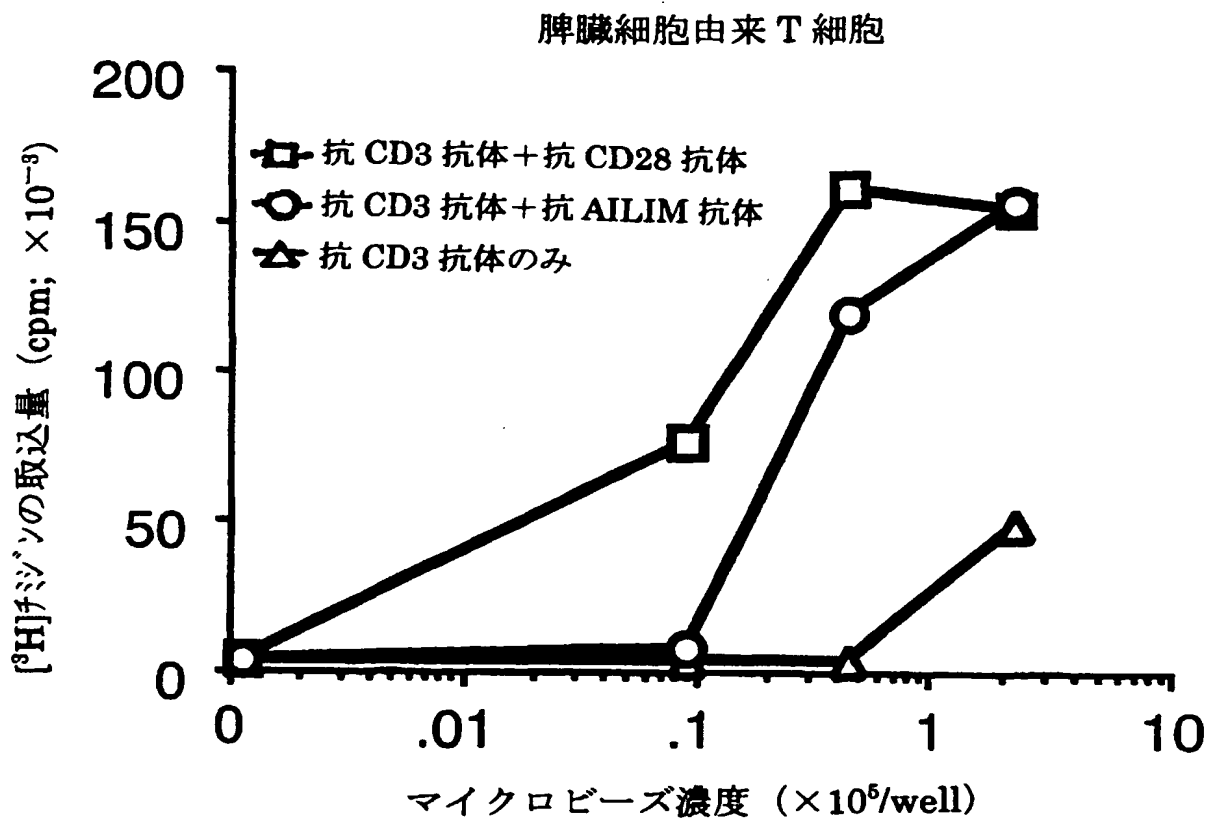
図 3 4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

35 / 52

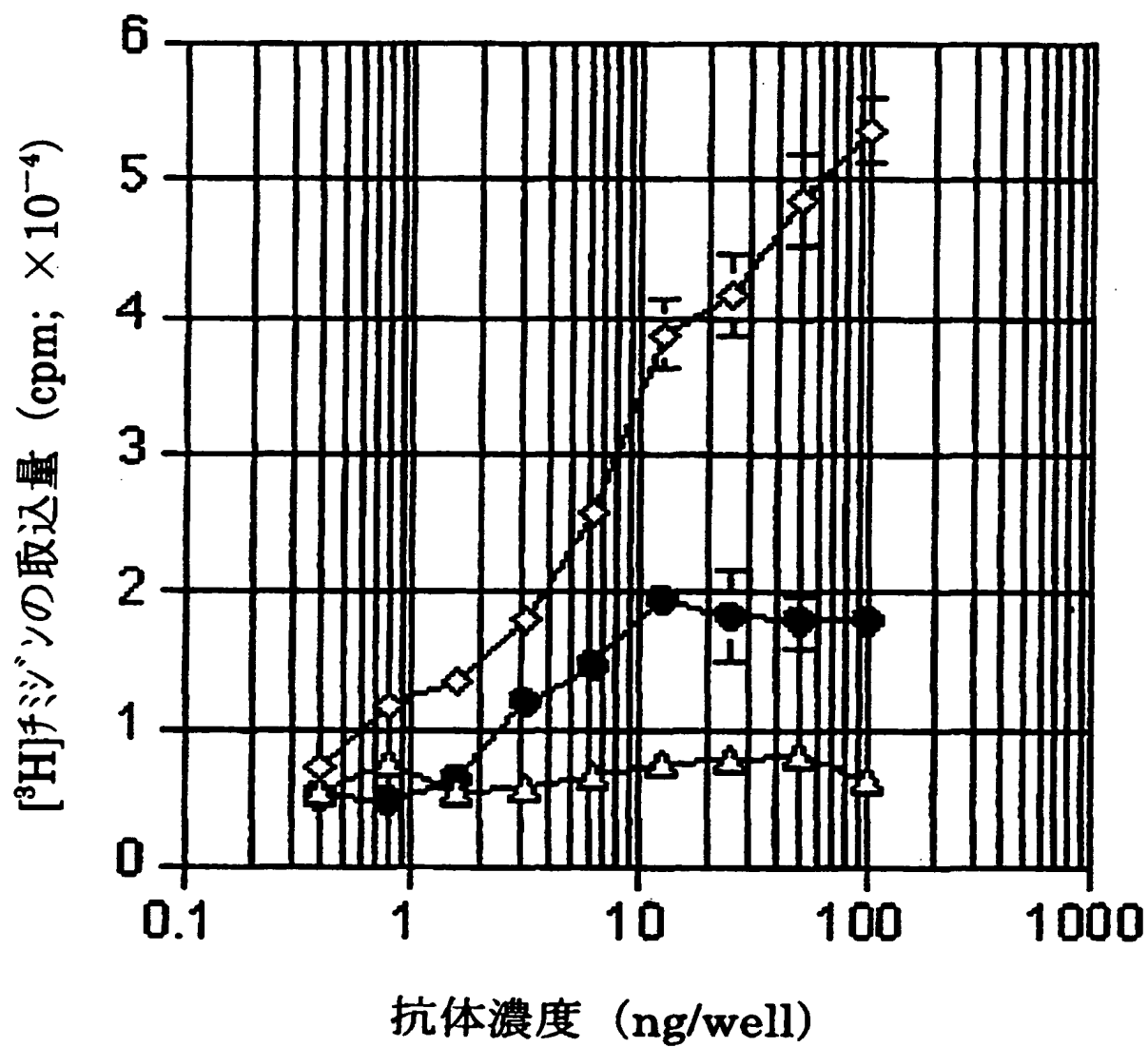
図 3 5



THIS PAGE BLANK (USE)

36/52

図 36



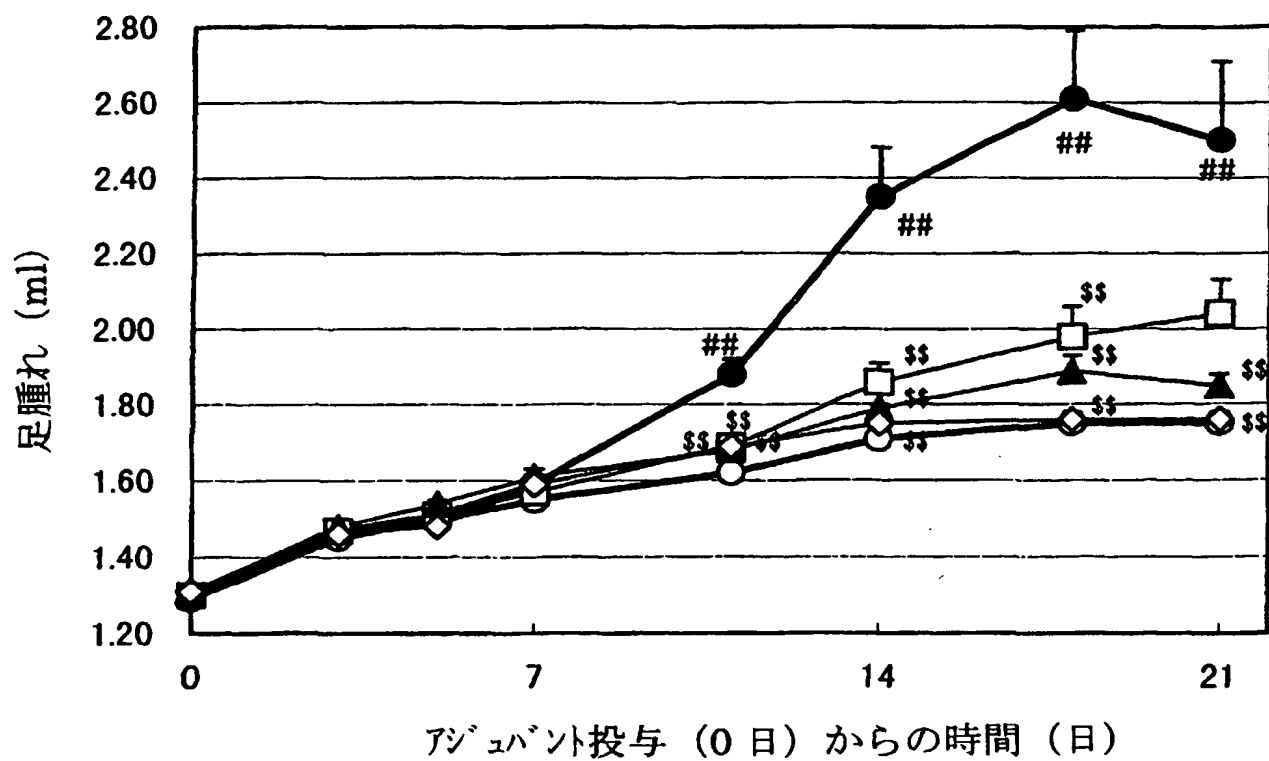
- ◇ 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体
- 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体
- △ 抗 CD3 抗体 + 対照抗体

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



37/52

図 37

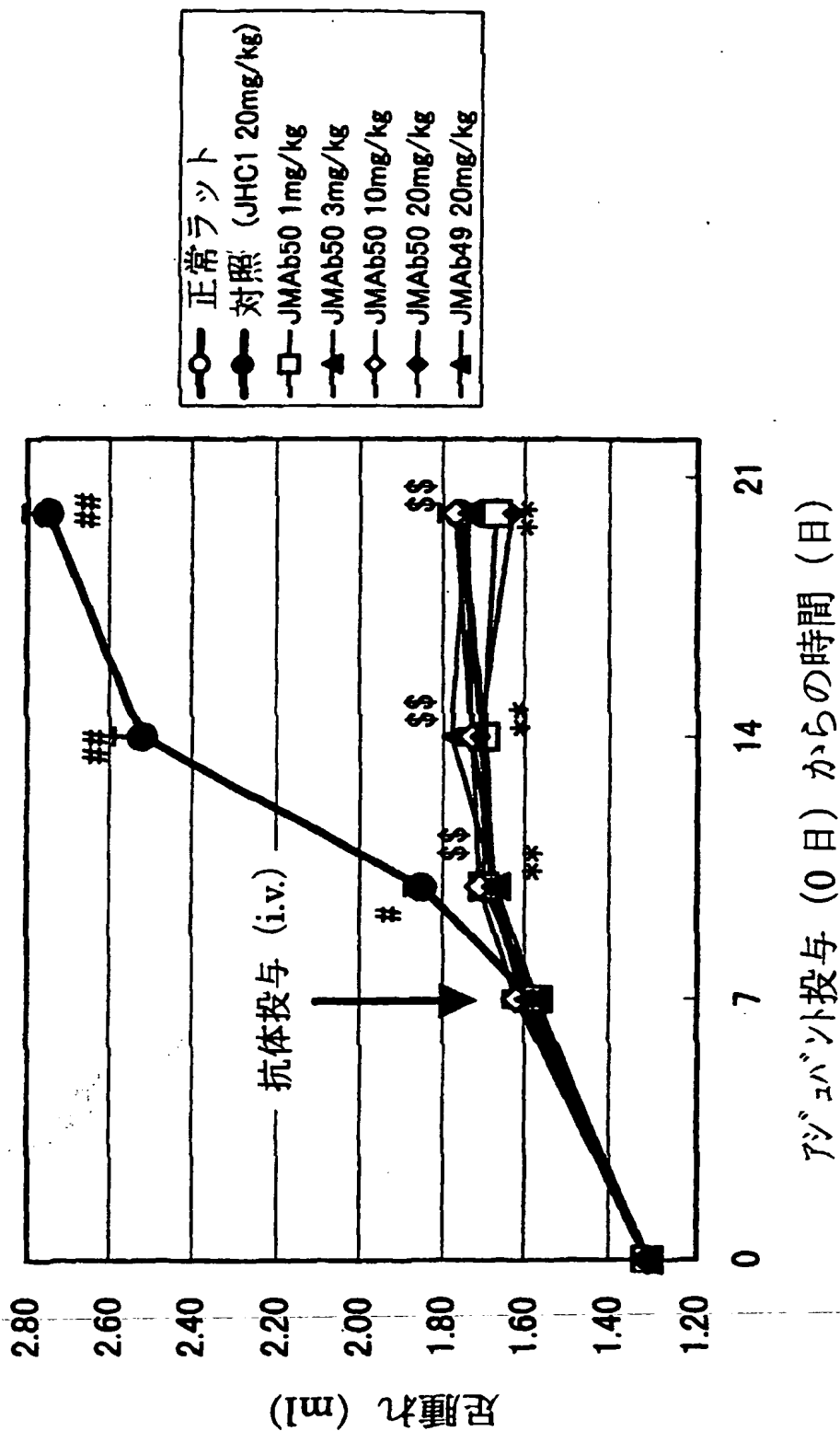


- 正常ラット
- 対照
- 3日目投与
- ▲ 5日目投与
- ◇ 7日目投与

THIS PAGE BLANK (USE)

38 / 52

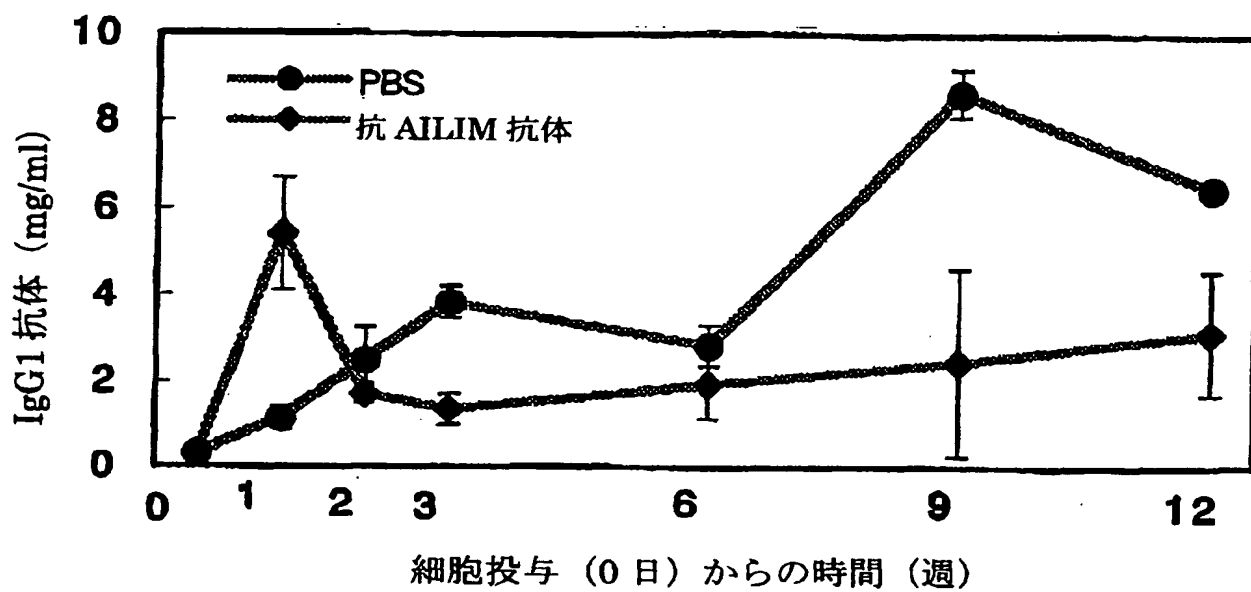
図 38



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

39/52

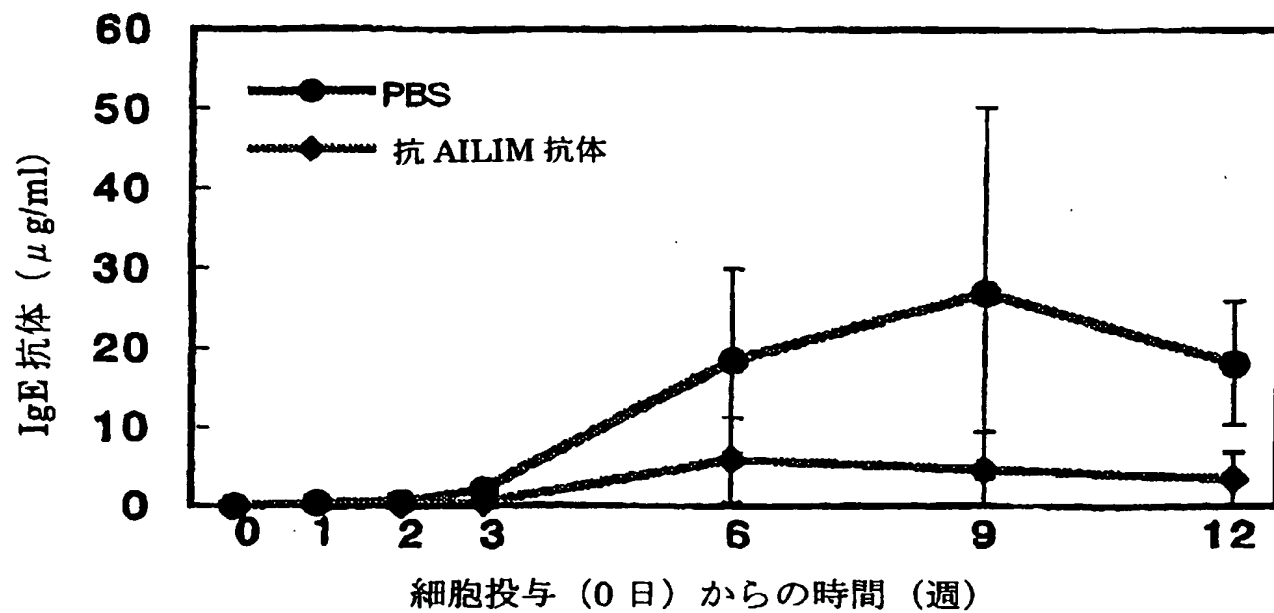
図 39



THIS PAGE BLANK (USPTO)

40/52

図 40

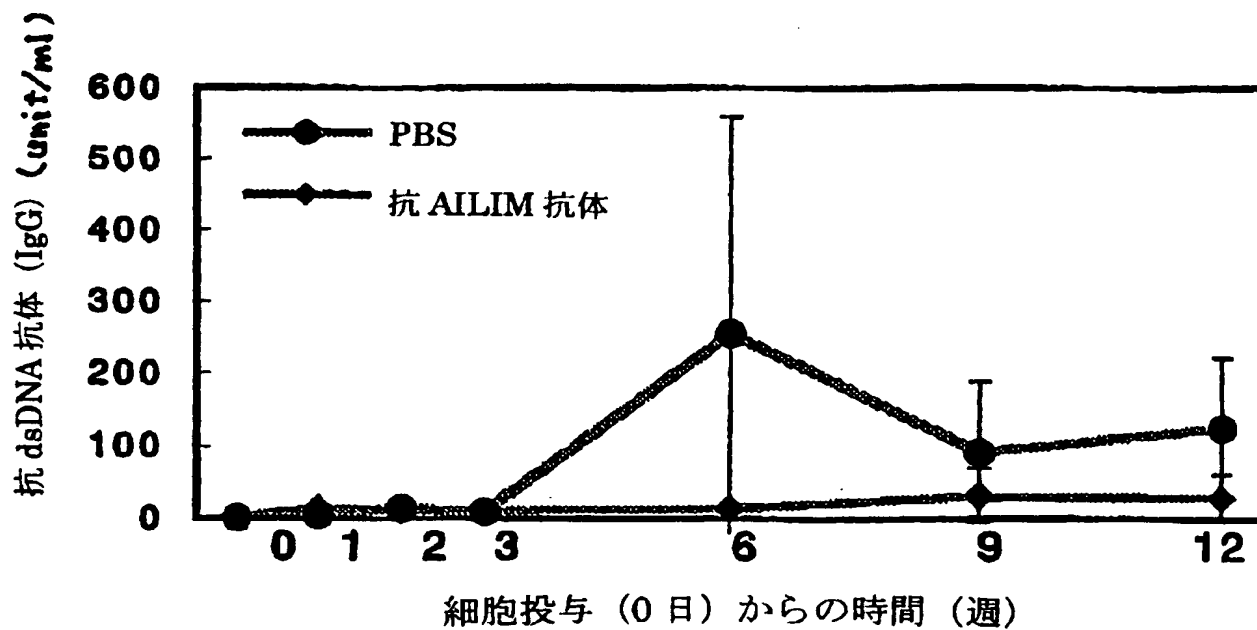


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



41/52

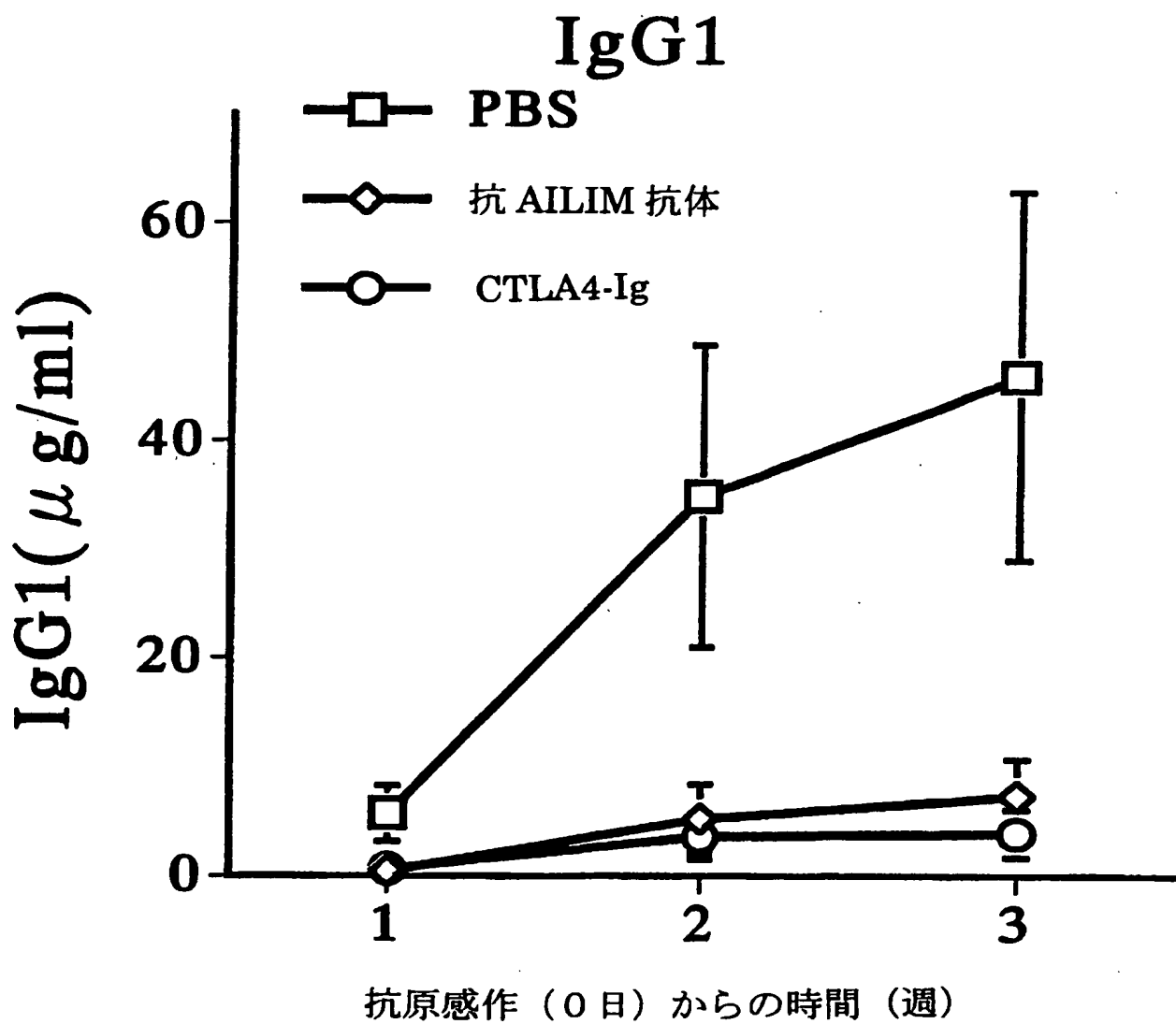
図 4 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

42/52

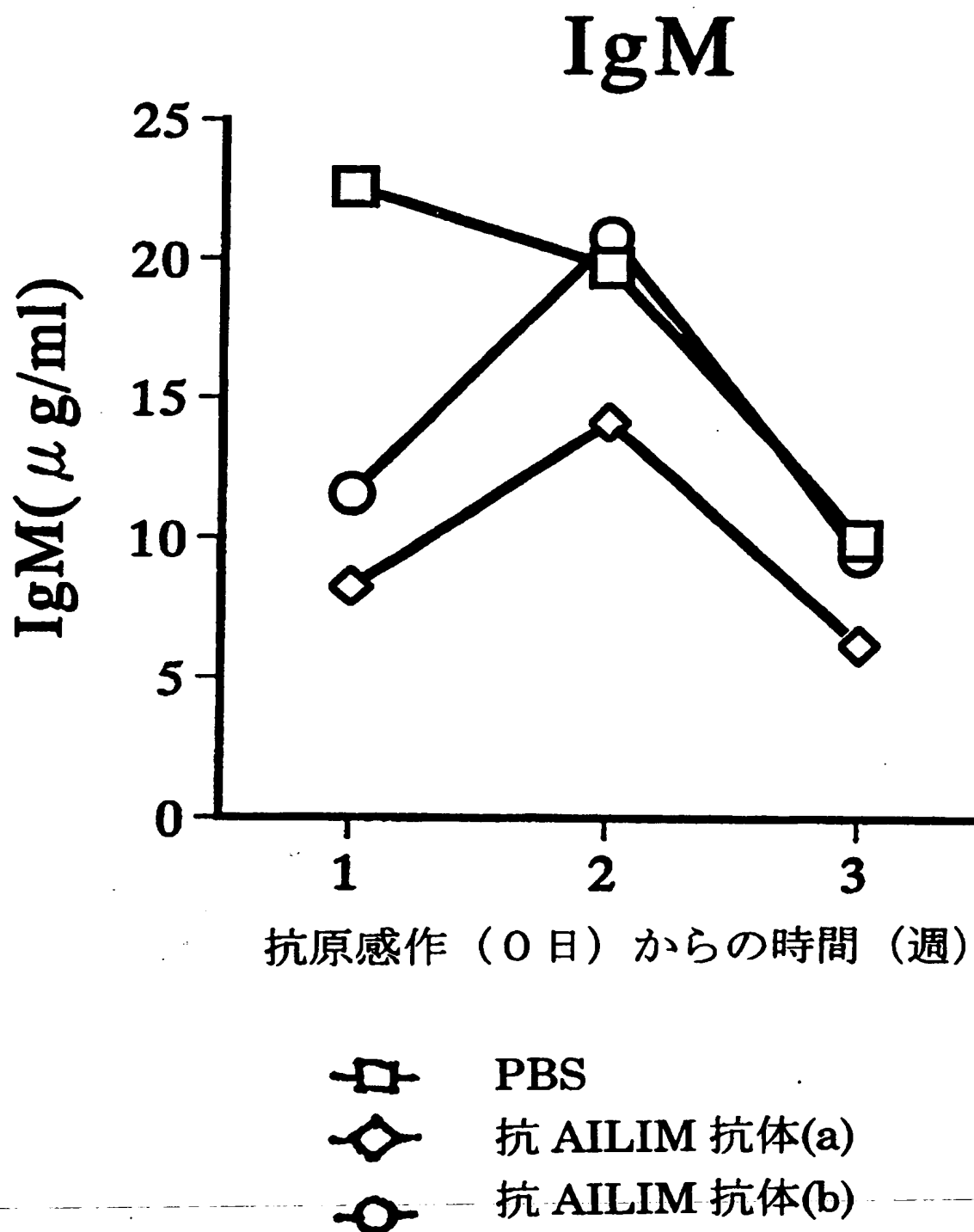
図 4 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

43/52

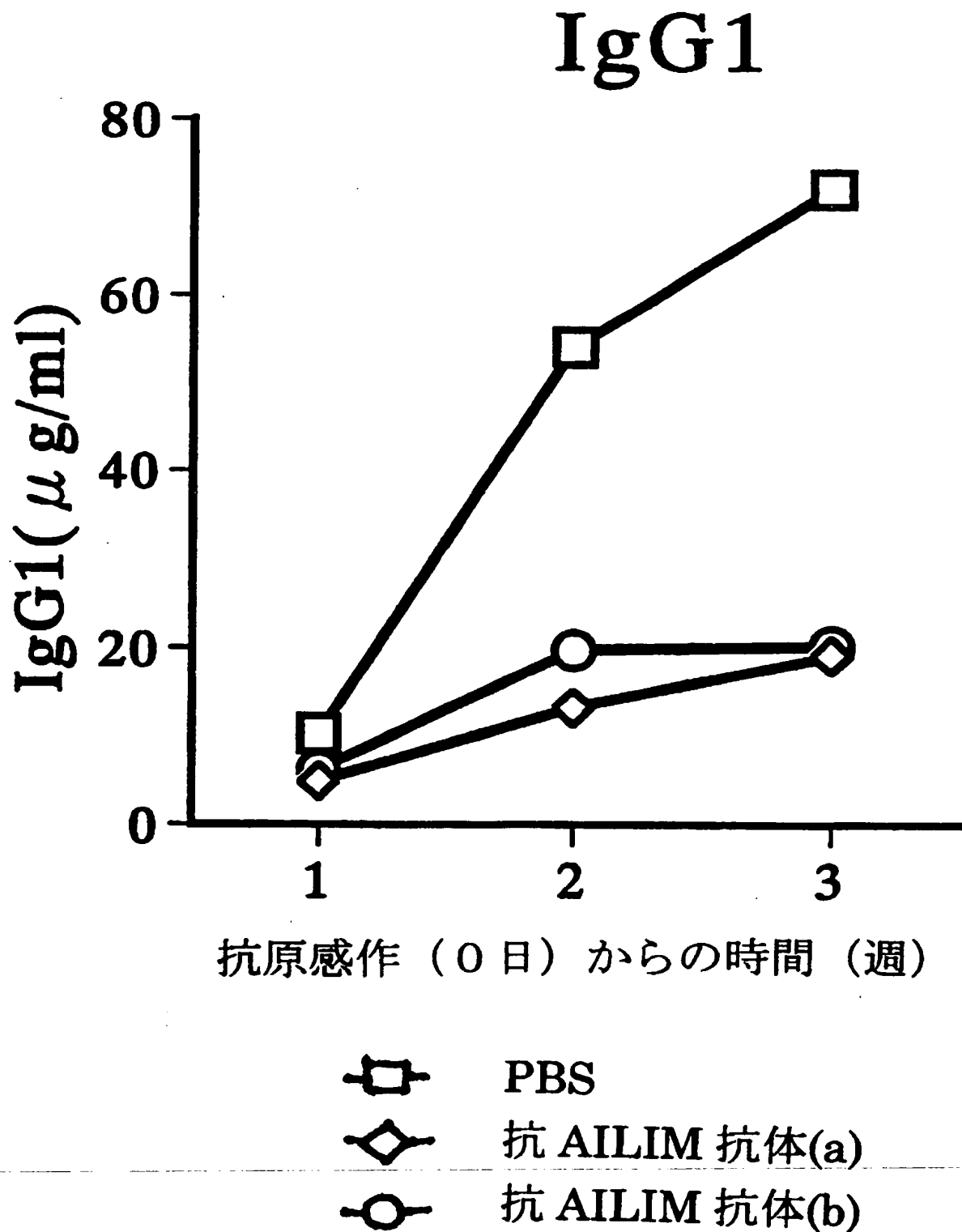
図 43



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

44/52

図 4 4

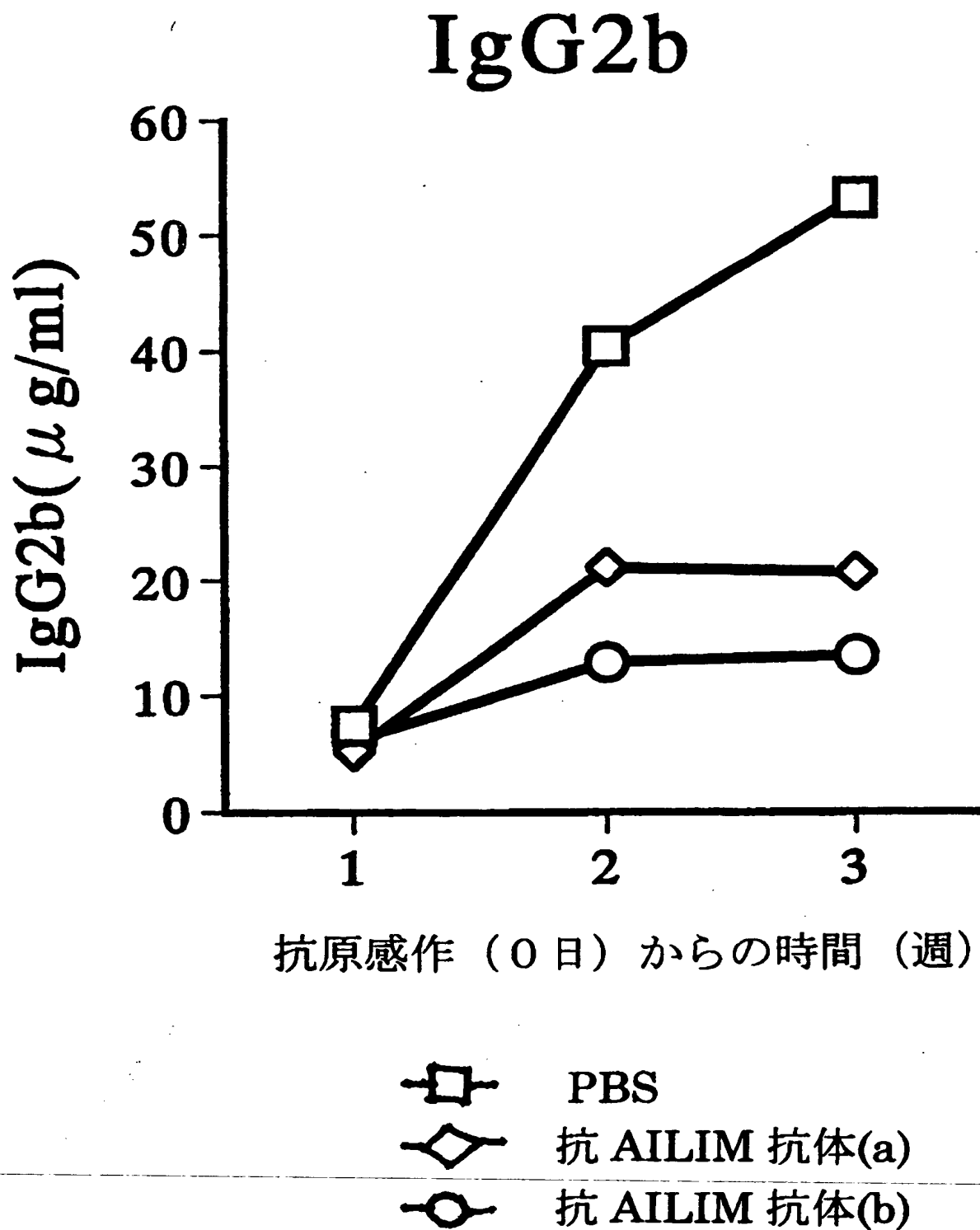


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



45/52

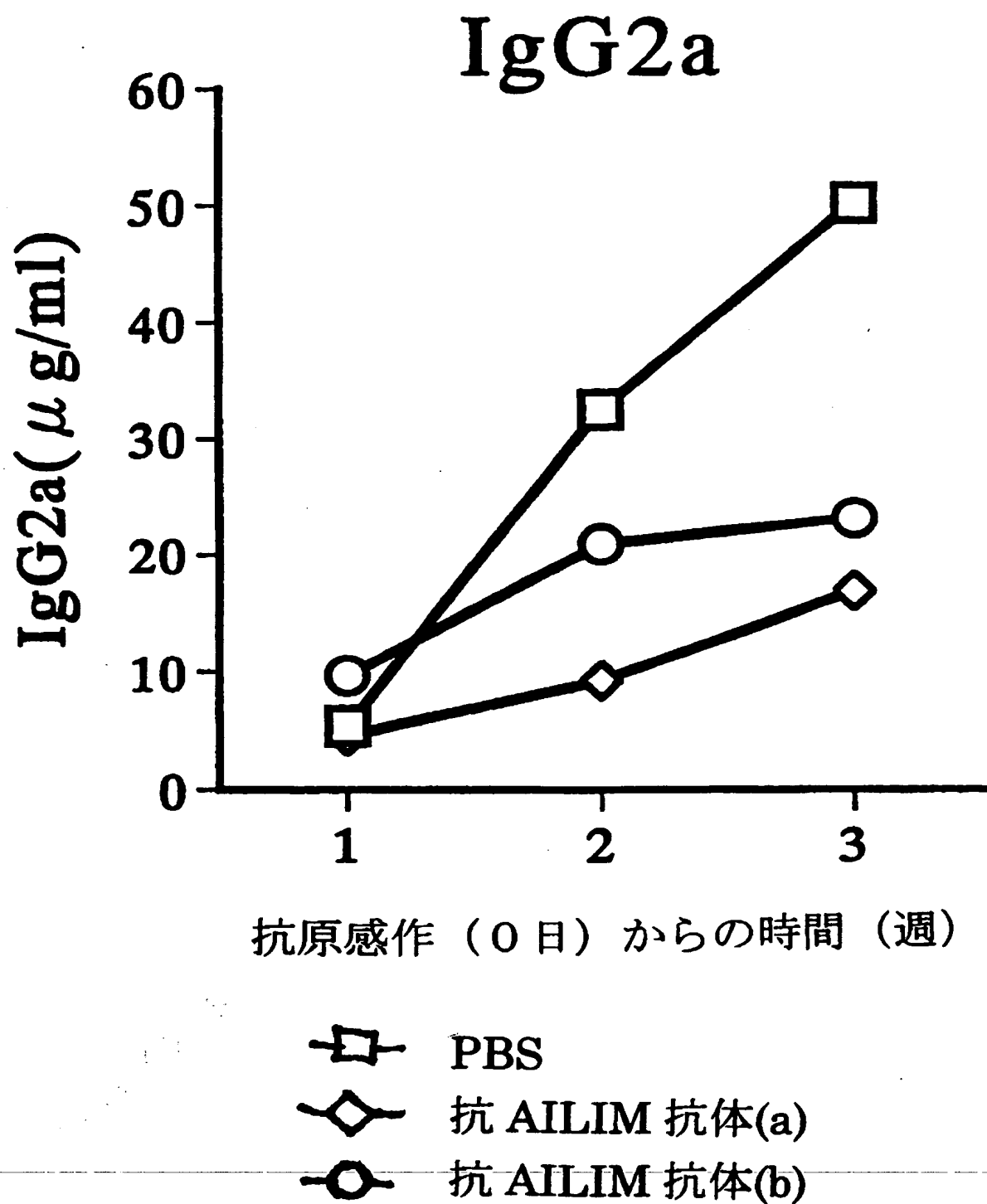
図 45



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

46/52

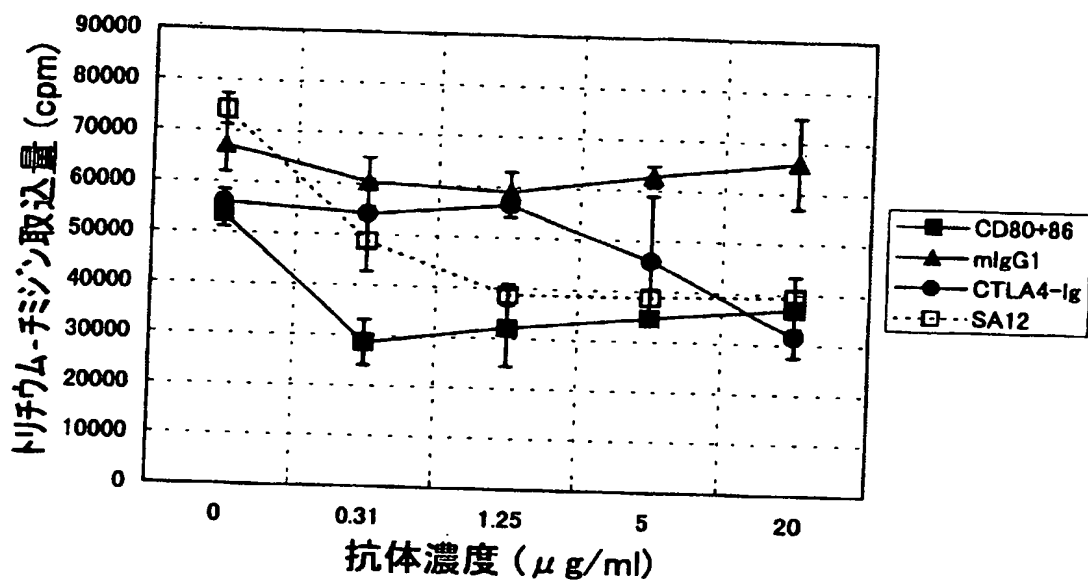
図 46



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

47/52

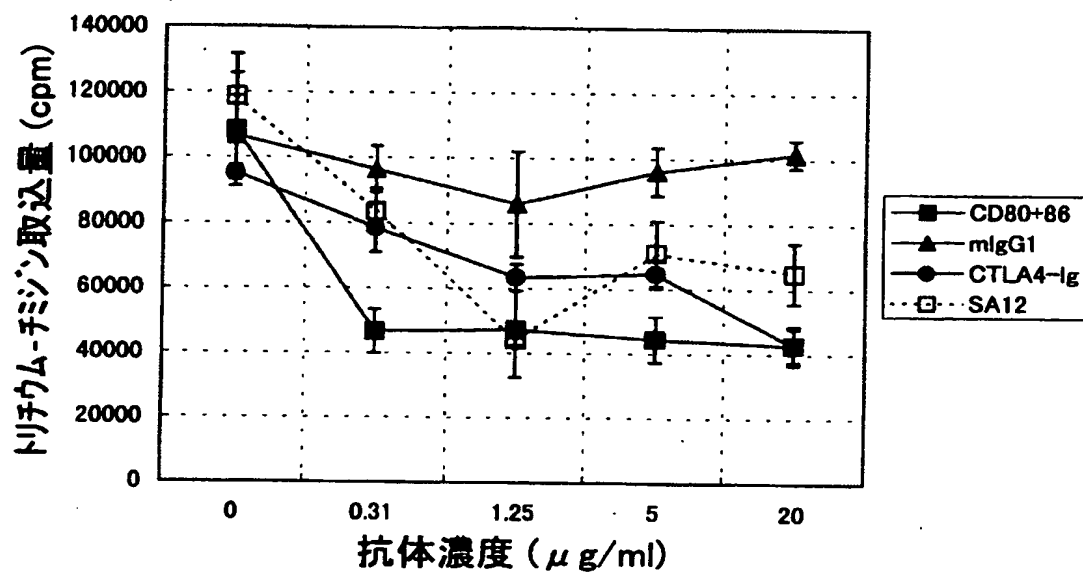
図 4 7



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

48 / 52

図 4 8

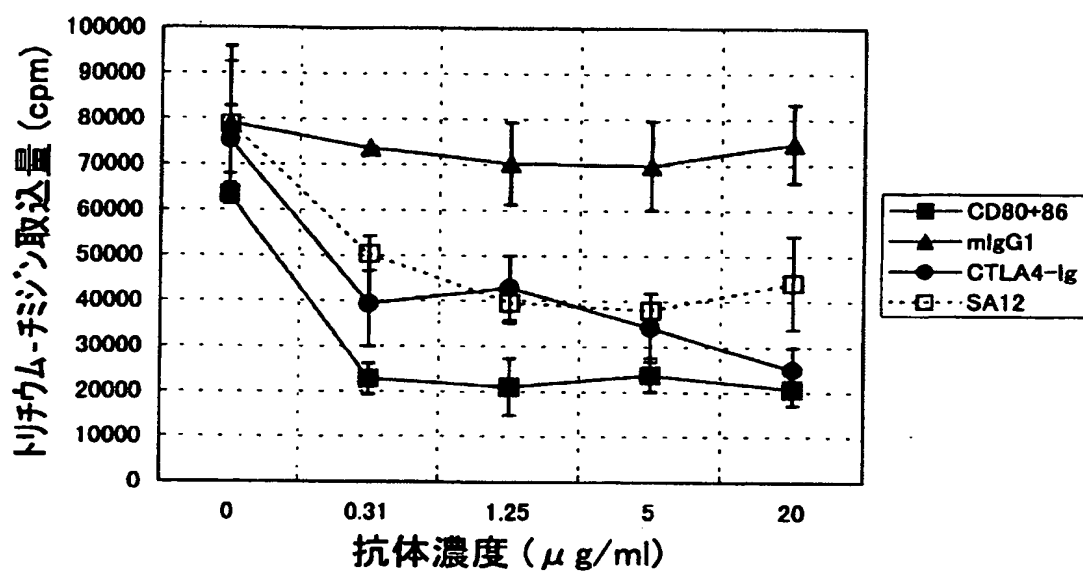


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



49/52

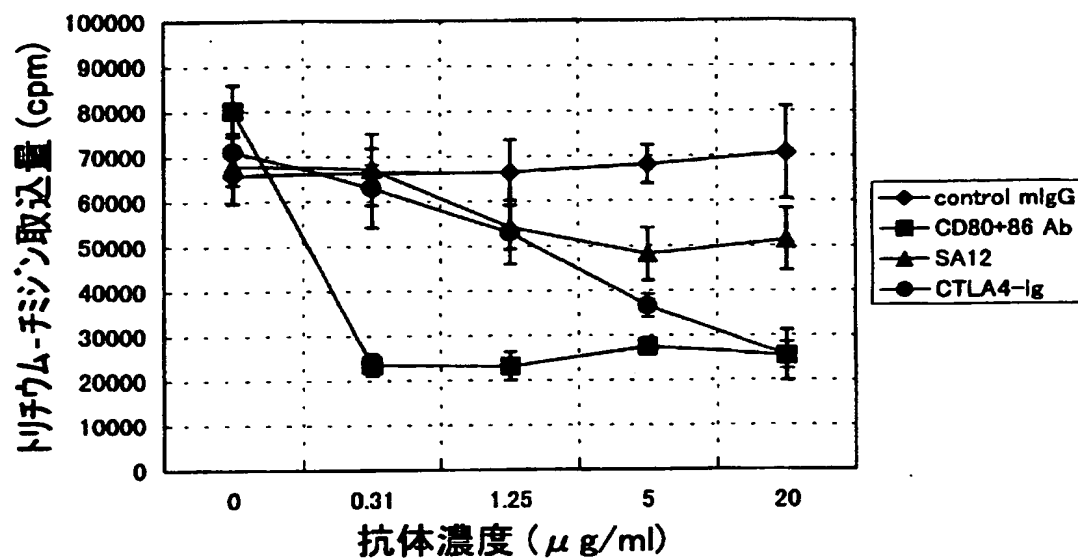
図 4 9



**THIS PAGE BLANK (U.S.)**

50/52

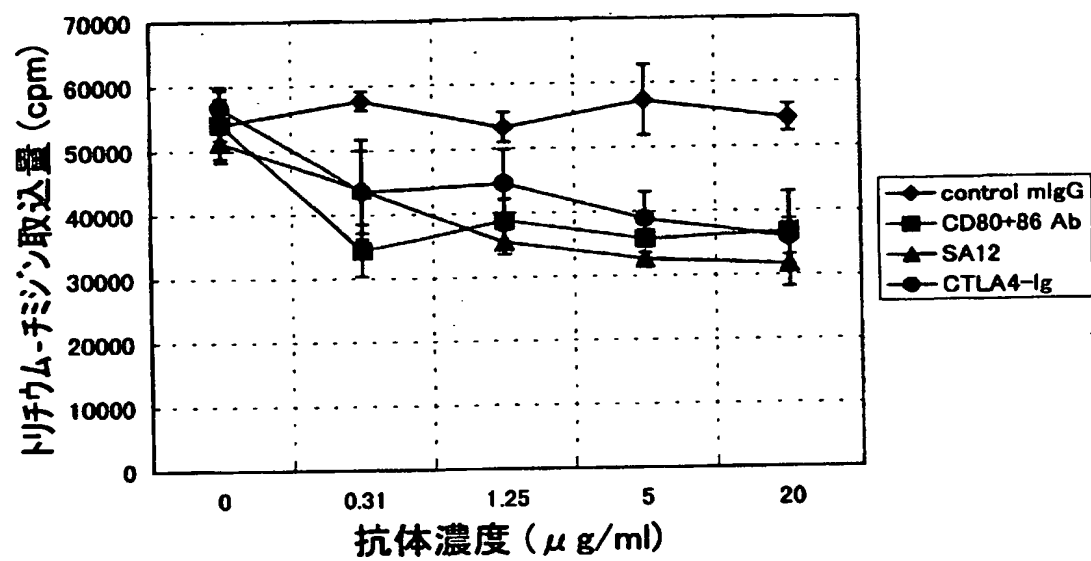
図 50



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

51/52

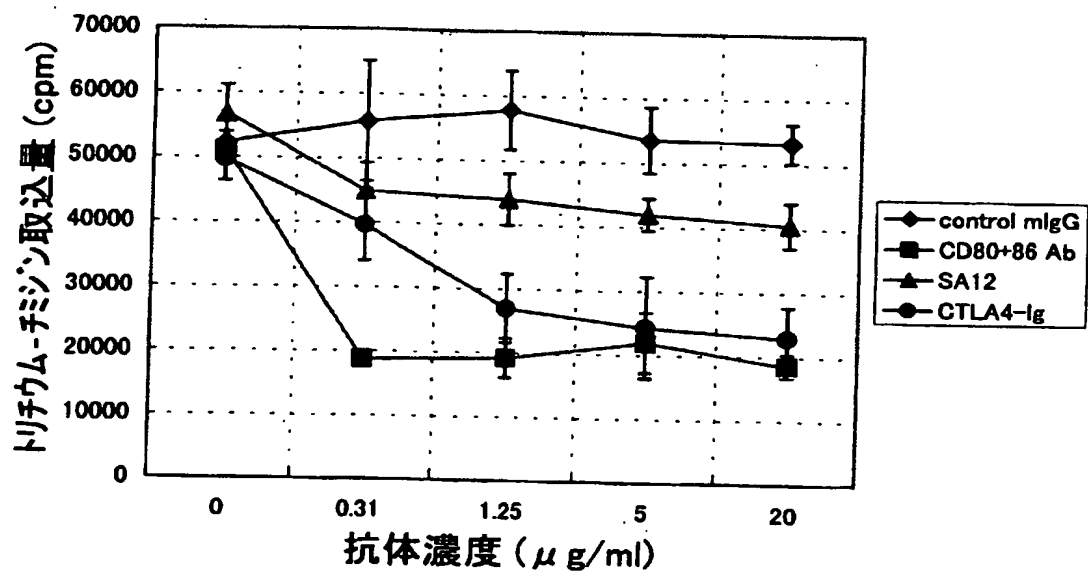
図 5 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

52 / 52

図 5 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05868

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02, Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN) , MEDLINE (STN) , EMBASE (STN) , BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/38216, A1 (JAPAN TOBACCO INC.), 03 September, 1998 (03.09.98), page 93, line 15 to page 95, line 23 & EP, 984023, A1 & JP, 11-029599, A & AU, 9861185, A1 & BR, 9807788, A & NO, 9904146, A	1-32
X	WO, 99/15553, A2 (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH- INSTITUTS), 01 April, 1999 (01.04.99), page 4, line 18 to page 5, line 1 & EP, 1017723, A2 & DE, 19821060, A1 & WO, 99/15553, A3 & AU, 9913320, A1	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 17 November, 2000 (17.11.00)	Date of mailing of the international search report 28 November, 2000 (28.11.00)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02,

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/38216, A1 (日本たばこ産業株式会社) 03. 9月. 1998 (03. 09. 98) 第93ページ 第15行-第95ページ 第23行 &EP, 984023, A1 &JP, 11-029599, A &AU, 9861185, A1 &BR, 9807788, A &NO, 9904146, A	1-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 00

国際調査報告の発送日

28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

津賀下

浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 99/15553, A2 (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH- INSTITUTS) 01. 4月. 1999 (01. 04. 99) 第4ページ第18行-第5ページ第1行 &EP, 1017723, A2&DE, 19821060, A1 &WO, 99/15553, A3&AU, 9913320, A1	1-32

- 1 -

## 明細書

## 免疫性疾患治療剤

技術分野

本発明は、AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule ; 別名を「JTT-1 抗原」、「JTT-2 抗原」、「ICOS (inducible co-stimulator)」または「8F4」という。) の生物活性、特に AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

具体的には、本発明は、AILIM 発現細胞の増殖を制御 (例えば抑制) するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカイン (例えば、インターフェロン $\gamma$  またはインターロイキン 4 など) の産生を制御 (例えば抑制) する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

さらに具体的には、本発明は、(1) 関節症 (例えば、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)、変形性関節症 (osteoarthritis; OA)) を抑制、治療または予防するための医薬組成物 ; (2) 炎症 (例えば、肝炎) を抑制、治療または予防するための医薬組成物 ; (3) 移植片対宿主反応 (graft versus host reaction; GVH reaction)、移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物 ; (4) 外来抗原若しくは自己抗原により惹起される免疫反応 (例えば、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、サイトカインの産生など) を抑制または予防するための医薬組成物に関する。

背景技術

哺乳動物の生体は、体内に侵入した病原微生物 (ウイルス、細菌、寄生虫など) や外来異物など (以下、併せて「抗原」と呼ぶ。) を排除しようとする免疫

- 2 -

応答システムを有する。その1つは、自然免疫応答システムと呼ばれ、他の1つは獲得免疫応答システムと呼ばれるものである。前者は、食細胞（多形核白血球、単球、マクロファージなど）による貪食、ナチュラルキラー（NK）細胞による攻撃、及び補体による抗原のオプソニン化などのような非特異的な認識による排除機構である。後者の獲得免疫応答システムは、該抗原に対する特異性を獲得（活性化）したリンパ球（主にT細胞、B細胞）による排除機構である。

抗原特異性を獲得したB細胞は、該抗原に特異的な抗体を産生することにより細胞外に存在する該抗原を攻撃する。抗原特異性を獲得（活性化）したT細胞は、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞（cytotoxic T cell; cytotoxic lymphocyte; CTL）に分類され、前者はB細胞の分化や抗体の産生を調節するとともに食細胞と協同して該抗原を破壊する。後者は、自らウイルス感染細胞などを攻撃する（実験医学（別冊）・「Bio Science 用語ライブラリー [免疫]」、羊土社、p. 14-17、1995）。

このT細胞による抗原特異性の獲得（活性化）は、T細胞が、マクロファージ、B細胞あるいは樹状細胞などの抗原提示細胞（antigen-presenting cells: APC）により提示される抗原を認識することにより開始される。抗原提示細胞は、取り込んだ抗原をプロセッシング（加工）し、この加工された抗原を主要組織適合性抗原複合体（MHC）に結合させて抗原提示する。T細胞は、抗原提示細胞により提示された該加工抗原を、その細胞膜表面に有するT細胞受容体（TcR）とCD3抗原との複合体（TcR/CD3複合体）を通じて認識することで細胞の活性化（特異性の獲得）のための第1のシグナルを受ける。

しかしながら、このTcR/CD3複合体を介した第1シグナルだけでは、T細胞の十分な活性化が起こらないだけでなく、その後に受ける如何なる刺激に対しても反応しなくなる不応答状態（unresponsiveness）またはクローン麻痺（clonal anergy）と呼ばれる状態に陥る。T細胞が活性化され抗原特異的なT細胞クローンに分化、増殖するためにはインターロイキン-2（IL-2）の自己分泌（オート

- 3 -

クリン ; autocrine) が必要であるが、クローン麻痺の状態では IL-2 などが産生されず細胞分裂が起こらないため、T 細胞が不活性化された状態となる。即ち、IL-2 などのサイトカインの産生を伴う T 細胞の活性化には、TcR/CD3 複合体を介した第 1 シグナルに引き続く第 2 のシグナルを必要とする。この第 2 のシグナルはコスティミュレイトリーシグナル (副刺激シグナル ; costimulatory signal) と呼ばれる。

T 細胞は、T 細胞表面上の TcR/CD3 複合体とは別の分子を介して抗原提示細胞上の MHC とは別の分子と相互作用 (細胞間接着) することによりこの第 2 のシグナルを受け取り細胞内に伝達する。この第 2 のシグナルにより細胞のアナジー (クローン麻痺) が回避されるとともに細胞が活性化される。

抗原提示細胞と T 細胞等のリンパ球との間の第 2 のシグナル伝達のメカニズムについては未だ詳細に解明されていない部分はあるものの、これまでの研究から、この第 2 のシグナル伝達には、主に T 細胞及び胸腺細胞で発現する細胞表面分子である CD28 (別名 : Tp44、T44、又は 9.3 抗原) と抗原提示細胞 (マクロファージ、単球、樹状細胞など) で発現する細胞表面分子である CD80 (別名 : B7-1、B7、BB1、または B7/BB1) 及び同じく抗原提示細胞状の細胞表面分子である CD86 (別名 : B7-2 または B70) との間の相互作用 (即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着) が極めて重要であることが明らかにされている。

さらにこの第 2 のシグナルによる T 細胞の活性化の制御には、該第 2 のシグナルに依存してその発現が増強されると考えられている CTLA-4 (Cytolytic T lymphocyte associated antigen 4) と該 CD80(B7-1)及び CD86(B7-2)との間の相互作用 (即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着) も重要な役割を担っていることが実験的に明らかにされてきている。即ち、この第 2 のシグナルの伝達による T 細胞の活性化の制御には、少なくとも CD28 と CD80/CD86 との間の相互作用、該相互作用に依存すると考えられる CTLA-4 の発現の増強、並びに CTLA-4 と CD80/CD86 との間の相互作用が包含されることが明らかにされてきている。

CD28 は、この T 細胞の活性化とアナジの回避に必要な第 2 のシグナル（コストимуレトリーシグナル）を伝達するコストимуレイター分子であることが明らかにされている。この分子が抗原提示細胞上のコストимуレイター分子である CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) と結合すること（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）により伝達される第 2 のシグナルは、Th1 型サイトカインの mRNA を安定化させ、その結果 T 細胞からの IL-2、IFN $\gamma$  及び TNF $\alpha$  などの Th1 型サイトカインを大量の産生を促す。一方、CTLA-4 は、TcR/CD3 を通じて入る第 1 シグナルにより発現が誘導されるとともに、CD28 と CD80 との結合により入る該第 2 のシグナルによってもその発現が増強されることが知られている。CTLA-4 は、それらのシグナルを受けて、CD28 より入る第 2 のシグナルによる T 細胞の活性化とは反対に T 細胞機能に対して抑制的に働くことが明らかになってきている。

ヒトの CD28 及び CTLA-4 は、各々 44kD 及び 41 乃至 43kD の分子量を有する I 型糖蛋白質である。ともに免疫グロブリン様ドメイン 1 個を有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞間接着分子としての機能と細胞内へのシグナル伝達分子としての両方の機能を併せ持った分子である。

ヒト CD28 はジスルフィド結合によりホモ二量体を形成し、一方、CTLA-4 は単量体で存在することが示されている。CD28 及び CTLA-4 の遺伝子の染色体上に位置は、ヒトにおいてはいずれも「2 q 3 3」、またマウスにおいては「1 C」であり、いずれも 4 つのエクソンからなる。ヒトの CD28 及び CTLA-4 は、リーダー配列を含め各々 220 及び 223 個のアミノ酸から構成され、両者のアミノ酸相同性は 20 乃至 30% 程度である。

CD28 及び CTLA-4 のリガンドは、ヒト及びマウスにおいて CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) であることが解明されている。CTLA-4 は、いずれのリガンドに対しても CD28 より親和性が高く、その差は約 20 倍である。CD28 及び CTLA-4 の CD80 (B7-1) への結合には、動物種を超えて保存されているアミノ酸配列構造であ



- 5 -

る「MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr)」が重要であることが明らかにされている。また、CD28 が刺激を受けると、その細胞内の部分配列「YMM (Tyr-Met-Asn-Met)」内のリン酸化されたチロシン残基へ PI3 キナーゼ (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) が会合することが示され、CD28 はこの「YxxM」構造を介して細胞内シグナル伝達において重要な働きをしていることが示されてきている。また、CTLA4 の細胞内領域にも「YxxM」で表わされる配列、即ち「YVKM (Tyr-Val-Lys-Met)」を有しており、刺激を受けた後、この配列に SYP が会合することが示されている。

CD28 は、胸腺細胞及び末梢血 T 細胞に局限して発現し、一方 CTLA-4 は活性化 T 細胞に特異的に発現することがわかってきている (細胞工学・別冊「接着分子ハンドブック」、秀潤社発行、第 93-102 頁、1994 年； 同誌、第 120-136 頁；

実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・免疫」、羊土社発行、第 94-98 頁、1995 年； 実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・細胞内シグナル伝達」、羊土社発行、第 58-59 頁、1997 年； 日本臨床、第 55 巻、第 6 号、第 215-220 頁、1997 年)。

このようにして T 細胞機能の制御 (T 細胞の活性化及び機能抑制) におけるコスティミュレーター分子 (CD28、CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) など) 並びに連動する CTLA-4 などの複数の分子の間の相互作用 (換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着) の重要性が提唱されるようになり、それらの分子と疾患との関係の解明、並びにそれらの分子の機能を制御することによる疾患の治療の試みが注目されるようになってきている。

前述のように、生体は、生体 (自己) にとって異物である抗原に対しては獲得免疫応答システムを作動させるが、自己の生体成分 (自己抗原) に対しては免疫応答を示さない免疫寛容を有している。しかしながら、何らかの原因で免疫寛容の破綻が起こると、自己抗原に対する免疫応答が起こり前述と同様のメカニズム

により自己抗原反応性 T 細胞が誘導され免疫異常状態に陥り、種々の自己免疫疾患が惹起される。

即ち、生体の免疫システムが正常な状態では、正常組織の無刺激の抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) はコスティミュレイトリー分子を発現しないため、例え自己抗原に反応する自己抗原反応性 T 細胞が存在していても、T 細胞が不応答状態に陥っているため自己寛容が維持されているが、免疫異常状態においては過剰または継続的なコスティミュレイトリー分子の発現以上により自己抗原反応性 T 細胞が活性化され自己免疫疾患が惹起されるという可能性が提示されている。

このような観点から近年、コスティミュレイトリーシグナルの伝達、例えば前述の CD28/CTLA-4-CD80/CD86 の間のシグナル伝達を調節することにより種々の自己免疫性疾患の治療の試みが多数なされてきている。

しかしながら、そのような治療の試みがなされる一方で、コスティミュレイトリー分子及び関連する分子との間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）による T 細胞の活性化のメカニズムの詳細な解明は未だなされておらず、またこのメカニズムには未だ同定されていない他の分子が関与する可能性も残っている。

最近本発明者らは、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T 細胞等のリンパ球の活性化に必須な第 2 のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化 T 細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規な哺乳動物（ヒト、マウス及びラット）由来の細胞膜表面分子を同定及び単離することに成功し、その分子を「JTT-1 抗原」または「JTT-2 抗原」と命名した（日本国特許出願公開 11-29599 号公報；国際特許出願公開 W098/38216 号；Int. Immunology, Vol.12, No.1, p.51-55, 2000）。なお、後に本発明者らはこれらの分子を AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule) と改名した。

- 7 -

本発明者らによるこれまでの研究から、この新分子 AILIM について下記のような知見が得られている。

(1) T 細胞の活性化に重要なコスティミュレイトリーシグナルを細胞間接着を介して伝達する T 細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CD28」並びに該シグナルに連動して活性化 T 細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う T 細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CTLA-4」と下記のような類似性を有する。

①システイン残基を含む 20 以上のアミノ酸残基が良く保存されている。

②リガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro (PPP)」が細胞外領域に保存されている。

③シグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM) (Xaa 及び x は任意のアミノ酸を意味する。）」が細胞内領域に保存されている。

④「マウス AILIM (マウス JTT-1 抗原)」をコードする遺伝子のマウス染色体上での位置は、マウスの「CD28」及び「CTLA-4」の位置と同く、「1 C 3」である。

(2) 細胞間接着を媒介する機能を有する「CD28」及び「CTLA-4」と同様に、「AILIM (JTT-1 抗原)」は胸腺細胞、ConA などのマイトジェンで刺激したリンパ芽球及び胸腺腫細胞の細胞間接着を媒介する能力を有する。

(3) AILIM は、少なくとも胸腺細胞、ConA などのマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞 (活性化 T リンパ芽球細胞や活性化 B リンパ芽球細胞)、末梢血リンパ球及び胸腺腫細胞で強く発現する。

(4) AILIM (JTT-1 抗原) に対する抗体は、ヒト末梢血リンパ球を有意に増殖させ、またその増殖は、T 細胞の活性化に必須な抗原提示細胞からの第 1 のシグナルを受け取る T 細胞上の TcR/CD3 複合体を構成する CD3 に対するモノクローナル抗体を共存させることによりさらに高い増殖を誘導する。

(5) AILIM (JTT-1 抗原) に対する抗体を、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) に投与することにより、その病状が抑制される。

(6) AILIM (JTT-1 抗原) に対する抗体を、糸球体基底膜 (GBM) 腎炎のモデルラットに投与することにより、その病状が抑制される。

本発明者らによる AILIM の同定及び性状解析の報告より後になって、クロチェク (Kroczek) らのグループにより、ヒト由来の AILIM と同一の分子である ICOS (inducible co-stimulator) または 8F4 と命名した分子の同定の報告がなされている (Nature, Vol.397, p.263-266, 1999、及び国際特許出願公開 W099/15553 号)。

AILIM (別名: JTT-1 抗原、JTT-2 抗原、ICOS、または 8F4) については、上述の報告があるのみであり、その生物学的機能並びに疾患との関わりについては未だ詳細に解明されていない。

一方、極最近になって、この副刺激伝達分子 AILIM と相互作用するリガンドと考えられる B7h、B7RP-1、GL50 あるいは LICOS と称される新規分子も同定されている (Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000)。

これら 2 種類の新規な分子、即ち、AILIM (ICOS) と B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS) の同定により、上述した T 細胞等のリンパ球の活性化及び活性化 T 細胞の機能制御に必須であるコスティミュレイトリーシグナルの伝達経路には、これまで知られていた CD28 と CD80(B7-1)/CD86(B7-2) との間のシグナル伝達経路、及び CTLA4 と CD80(B7-1)/CD86(B7-2) との間のシグナル伝達経路である第一及び第二の経路の他に AILIM (ICOS) と B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS) との相互作用による新しい第三の経路があることが判明することとなった。

この新しい 2 つの分子の各々の生物学的機能、該分子による第三のコスティミュレイトリーシグナル伝達による T 細胞等のリンパ球の機能制御、並びに該新規なシグナル伝達と疾患との関連性については、目下精力的に研究が進められているところである。

### 発明の開示

即ち、本発明は、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規分子 AILIM の生物学的機能並びに AILIM の発現と疾患との関わりを明らかにするとともに、該 AILIM の生物学的機能を医学及び薬学的手法（例えば、低分子化合物及び抗体等の薬剤）により制御することにより AILIM の発現の状態に依存する種々の疾患の発症を抑制し、または該疾患を治療する方法及び薬剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、哺乳動物の AILIM の生物学的機能、AILIM の種々細胞での発現の状態、及び AILIM の発現と疾患との関連性に関して、鋭意研究を重ねた結果、上述したこれまでに得られている AILIM に関する知見に加えて、さらに下記知見を見出し本発明を完成するに至った。

(I) 正常マウスのリンパ組織の一つである胸腺のT細胞においては、CD3 の発現の高い細胞で同様に AILIM の高い発現が見られ、両者の発現は相関性が認められる。一方、対照的に、コスティミュレイトリー分子である CD28 の発現は CD3 の発現が高いほど低下していた。マウス正常胸腺T細胞においては、AILIM の発現と CD28 の発現は相反する動態を示した。正常マウス胸腺由来T細胞においては、CD4 陰性 CD8 陰性 T 細胞では、AILIM 及び CD28 ともにその発現が認められない。正常マウス胸腺由来T細胞においては、CD28 の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性 T 細胞で最大となり、その後の細胞分化を経た CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞または CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞においてその発現が減少する。一方、正常マウス胸腺細胞においては、AILIM の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性 T 細胞では僅かしか認められないものの、その後の細胞分化を経た CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞または CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞で高い発現が認められる。正常マウス胸腺T細胞における AIL

- 10 -

IMの発現は、CD3だけでなくCD4及びCD8の発現との相関性の点においてもCD8の発現とは異なるものである。

(II) 正常マウスのリンパ組織の一つである脾臓及びリンパ節のT細胞におけるAILIMの発現は、マウス胸腺由来T細胞での発現と比べ僅かであり、CD4陽性T細胞の極少数（CD4陽性T細胞の約1乃至3%）においてAILIMの発現が認められる。

(III) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及びLPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導したマウス肝炎モデルの肝臓組織由来T細胞（単核細胞）においては、AILIMの顕著な発現が認められる。その発現は正常マウス脾臓由来のCD4陽性細胞またはリンパ節由来T細胞でのAILIMの発現に比べ著しく高いものである。

(IV) 健常人の末梢血由来細胞においては、AILIM陽性細胞のほとんどがCD4陽性CD8陰性細胞であり、AILIM陽性細胞のほとんどがT細胞である。健常人末梢血由来には、僅かではあるがB細胞においてもAILIMを発現が認められる。

(V) 関節リウマチ (RA) 患者の関節腔液中の関節組織浸潤T細胞 (CD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞) においては、同患者の末梢血中のT細胞及び健常人の末梢血中のT細胞のいずれに比べても、有意に高いAILIMの発現が認められる。

(VI) 変形性関節症 (OA) 患者の関節腔液中のCD4陽性T細胞においても、AILIM陽性細胞の比率が有意に上昇している。また、進行性全身性硬化症 (PSS) 患者のCD4陽性T細胞においてもAILIM陽性細胞の比率が有意に上昇している。

(VII) マウスリンパ組織由来のT細胞においては、抗CD3抗体、コンカナバリンA (*Concanavalin A*; ConA)、またはPMA (*phorbol myristate acetate*) とIonophoreで刺激すると約3乃至6時間後にAILIMの発現の上昇が認められ、刺激後約12時間で最大のAILIMの発現が認められる。刺激から約24時間以降においてもAILIMの高い発現が認められ、その発現は、約48時間後でも同程度の発現が維持される。

- 1 1 -

(VIII) ヒト末梢血 T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞) を PMA 及び Ionophore で活性化すると、刺激後約 8 時間後に AILIM の高い発現が認められる。また、ヒト末梢血 T 細胞においては、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体、または抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体のいずれの刺激によっても AILIM の高い発現が誘導される。

(IX) AILIM は、Th2 タイプのサイトカイン産生の性状を有する株化 T 細胞 (D 10, MS202, CD28K0, EL-4 など) でコンスティテューティブ (constitutive) な発現が認められる。また、それらの細胞株での AILIM の発現は、CD28 の発現と同等またはそれ以上に高い発現である。

(X) 正常マウス及びラットの脾臓または胸腺由来の T 細胞または健常人の末梢血由来の T 細胞を、本発明を構成する抗 AILIM 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該 T 細胞からのサイトカイン (IFN  $\gamma$ 、IL-4、TNF  $\alpha$ 、IL-2、IL-10) の産生及び T 細胞の増殖が誘導される。

(XI) ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、本発明を構成する抗 AILIM 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該 T 細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進される。また、この結果は、ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、抗 CD28 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等である。

(XII) 正常脾臓及び胸腺の各々から単離した胸腺細胞及び脾臓細胞 (各々粘着性細胞を除去) を抗 CD3 抗体をコーティングしたプレート中で培養することにより T 細胞反応を惹起した T 細胞に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を添加すると、該 T 細胞からのサイトカイン (例えば、インターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン 4 (IL-4) など) の産生が抑制されるとともに、該 T 細胞の増殖が抑制される。また、該抗 AILIM 抗体による T 細胞反応 (前記サイトカイン産生、細胞増殖など) の抑制は、抗体の濃度に依存するものである。一方、抗 AILIM 抗

- 1 2 -

体の代わりに抗 CD28 抗体を加える場合には、抗 AILIM 抗体を用いた場合の結果は逆に該 T 細胞反応が増強される。

(XIII) *P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) 及び LPS (*Lipopolysaccharide*) を投与することにより誘導した肝炎モデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与すると、抗体濃度依存的に血中の IFN- $\gamma$  の上昇が有意に抑制されるとともに、GOT/GPT の上昇が有意に抑制される。

(XIV) 結核死菌を投与することによる誘導した関節炎モデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与すると、抗体濃度依存的に足腫れが有意に抑制されるとともに、関節炎の種々のパラメーターの上昇が有意に抑制される。

(XV) 移植片対宿主病 (*graft versus host disease*; GVHD) のモデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与すると、移植片対宿主反応 (*GVH reaction*) の産物である IgG 及び IgE の産生が有意に抑制されるとともに、自己抗体価の指標である抗 dsDNA 抗体の産生の上昇が有意に抑制される。

(XVI) 外来抗原としてのヒツジ赤血球 (*sheep red blood cell*; SRBC) を感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与 (感作直後または数日後) すると、外来抗原である該 SRBC に対する抗体の産生の上昇が有意に抑制される。また、その抑制効果は、CTLA4-Ig を投与した場合の抑制効果よりも高いものである。

(XVII) 外来抗原としての NP-KLH を感作することにより誘導した過剰な外来抗原に対する抗体産生を起こすモデル動物に、本発明を構成する抗 AILIM 抗体を投与 (感作直後または数日後) すると、外来抗原である該 NP-KH に対する抗体の産生の上昇が有意に抑制される。

(XVIII) 抗 AILIM 抗体が、異なる健常人ドナー由来の末梢血単核球 (PBMC) と T 細胞とのアロジェニック混合リンパ球反応 (MLR) における T 細胞の細胞増殖を有意に抑制する。



- 13 -

本発明の医薬組成物は、AILIMを発現する細胞へのAILIMを介するコストイミュレイトリーシグナル（副刺激シグナル）の伝達が関与する種々の生体反応（例えば、AILIMを発現する細胞の細胞増殖、AILIMを発現する細胞によるサイトカインの産生、AILIMを発現する細胞の免疫細胞溶解（immune cytotoxicity）若しくは細胞死（apoptosis）、及びAILIMを発現する細胞に対する抗体依存性細胞障害を誘導する活性など）を制御するための医薬品として、及び／または該AILIMを介するシグナル伝達が関与する種々の疾患の発症及び／または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

具体的には、本発明の医薬組成物は、AILIM発現細胞の増殖の制御（抑制または促進）またはAILIM発現細胞によるサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン4など）の産生を制御（抑制または促進）することが可能であり、AILIMを介するシグナル伝達が関与する様々な生理現象により惹起される種々の病的状態の抑制、及び種々の疾患の治療または予防を可能にする。

本発明の医薬組成物を用いることにより、例えば、関節症（例えば、関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）、変形性関節症（osteoarthritis; OA））、炎症（例えば、肝炎）、移植片対宿主反応（graft versus host reaction; GVH reaction）、移植片対宿主病（graft versus host disease; GVHD）、組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原若しくは自己抗原により惹起される免疫反応（例えば、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、サイトカインの産生など）を抑制、予防及び／または治療することが可能である。

また、本発明の医薬組成物は、抗炎症薬としての種々のステロイド剤が適用されているような任意の炎症の治療または予防に適用することが可能である。

本発明の医薬組成物の適用が可能な炎症性疾患としては、例えば、種々の関節炎（関節リウマチ、変形性関節症など）に伴う炎症、肺炎、肝炎（ウイルス性の肝炎を含む）、感染症に伴う炎症、炎症性腸疾患、腸炎、腎炎（糸球体腎炎、腎線維症に伴う炎症）、胃炎、血管炎、脾炎、腹膜炎、気管支炎、心筋炎、脳炎、

- 1 4 -

虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、組織や臓器の移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、種々の皮膚の炎症（乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬など）、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症、自己免疫性甲状腺炎などが挙げられる。

即ち、本発明は、下記(1)乃至(32)に記載されるとおりの発明である。

(1) AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(2) 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(1)に記載の医薬組成物。

(3) 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする前記(1)または前記(2)に記載の医薬組成物。

(4) 該関節症が、関節リウマチであることを特徴とする前記(1)乃至前記(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(5) 該関節症が、変形性関節症であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(6)に記載の医薬組成物：

a) AILIM に結合する抗体またはその一部；

b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；

- 15 -

c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び

d) AILIMに結合するポリペプチド。

(8) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(8)に記載の医薬組成物。

(10) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(11) 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(10)に記載の医薬組成物。

(12) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(11)に記載の医薬組成物。

(13) 該炎症が、肝炎であることを特徴とする前記(10)乃至前記(12)のいずれかに記載の医薬組成物。

(14) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(10)乃至前記(13)のいずれかに記載の医薬組成物。

(15) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(14)に記載の医薬組成物：

a) AILIMに結合する抗体またはその一部；

b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；

- 16 -

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド ; 及び

d) AILIM に結合するポリペプチド。

(16) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(10)乃至前記(13)のいずれかに記載の医薬組成物。

(17) 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(16)に記載の医薬組成物。

(18) AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(19) 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(18)に記載の医薬組成物。

(20) 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする前記(19)に記載の医薬組成物。

(21) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(18)乃至前記(20)のいずれかに記載の医薬組成物。

(22) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(21)に記載の医薬組成物 :

a) AILIM に結合する抗体またはその一部 ;

b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド ;

c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド ; 及び

- 17 -

d) AILIMに結合するポリペプチド。

(23) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(18)乃至前記(20)のいずれかに記載の医薬組成物。

(24) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(23)に記載の医薬組成物。

(25) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、外来抗原または自己抗原により惹起される免疫反応を抑制するための医薬組成物。

(26) 該免疫反応が、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、またはサイトカインの産生であることを特徴とする前記(25)に記載の医薬組成物。

(27) 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする前記(25)または前記(26)に記載の医薬組成物。

(28) 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする前記(27)に記載の医薬組成物。

(29) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の医薬組成物。

(30) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記(29)に記載の医薬組成物：

a) AILIMに結合する抗体またはその一部；

b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；

c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び

d) AILIMに結合するポリペプチド。

- 18 -

(31) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記(25)乃至前記(28)のいずれかに記載の医薬組成物。

(32) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記(31)に記載の医薬組成物。

以下、本発明で用いられる抗体の一般的製造方法、並びに本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトである。

本発明における「AILIM」とは、「activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule」の略称である。このAILIMは、最近本発明者らが同定、単離し、日本国特許出願公開平 11-29599 号公報（平成 10 年特許出願第 62217 号）及び対応する国際特許出願公開 W098/38216 号公報（国際特許出願番号 PCT/JP98/00837）中において報告した「JTT-1 抗原」または「JTT-2 抗原」と命名した哺乳動物由来の新規細胞膜表面分子を意味する。

具体的には、上記特許出願公開公報において、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を有するヒト AILIM（ヒト JTT-1 抗原）、配列番号 4 または配列番号 6 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を有するラット AILIM（ラット JTT-1 抗原）並びに配列番号 5 に記載されるアミノ酸配列を有するマウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）を意味する。

ヒト AILIM と全く同一のヒト由来分子について、クロチェク（KroczeK）らのグループが、本発明者らによる前記 2 つの特許出願の公開公報の公開日より後に公開された 2 つの文献中で報告している。彼らはそのヒト由来分子を、ICOS (inducible co-stimulator) または 8F4 と命名している（国際特許出願公開 W099/15553 号公報、及び Nature, Vol.397, p.263-266, 1999）。当該 ICOS または 8F4

と命名されたヒト由来の分子もヒト AILIM と同一分子として本願に取り入れられる。

また、本発明で言う「AILIM」には、該既報の文献中に記載された各々の哺乳動物の AILIM のアミノ酸配列、特に好ましくはヒト AILIM のアミノ酸配列（日本国特許出願公開平 11-29599 号公報及び対応する国際特許出願公開 W098/38216 号公報に記載される配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列）と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、該既報のアミノ酸配列を含むポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは 1 乃至 10 個のアミノ酸、特に好ましくは 1 乃至 5 個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本願発明の「AILIM」の範囲に包含されることを意味する。

そのようなアミノ酸の置換、欠失、または挿入は常法に従って行うことができる（実験医学別冊・「遺伝子工学ハンドブック」（1992）など）。

例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法（gapped duplex）法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131 酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNA セグメント合成法などを挙げることができる。

合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入（gapped duplex）法は、例えば下記のように行うことができる。アンバー変異をもつ M13 ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージ DNA を調製する。アンバー変異をもたない M13 ベクターの RFIDNA を制限酵素処理により線状とし、上記

- 20 -

の一本鎖ファージ DNA と混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼの反応により閉環状 2 本鎖 DNA とする。この DNA をミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌 mutS 株にトランスフェクションし、増殖したファージをサプレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。

また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、例えば下記のような原理を利用する。DNA を亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンは一ホキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化された DNA を細胞に導入すると、DNA 複製時に一ホキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖 DNA 断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

本発明における「マイトジェン」とは、分裂促進剤とも呼ばれ、細胞分裂を誘起する物質を指す。免疫学的には、抗原非特異的 (ポリクローナル) にリンパ球を幼弱化し分裂を誘起させるものを意味する。例えば、PHA や PWM などのレクチン、コンカナバリン A (Concanavalin A; ConA)、リボ多糖、ストレプトリシン S、抗リンパ球抗体などが挙げられる。コンカナバリン A や PHA は、T リンパ球のみに作用し、リボ多糖は B リンパ球のみに作用し、PWM は両リンパ球に作用することが知られている。

本願明細書中で用いられる「リンパ芽球細胞」なる用語は、大リンパ球、リンホブラスト (lymphoblast) あるいは免疫芽細胞とも呼ばれ、リンパ性組織 (リンパ節、脾臓、胸腺、骨髓、リンパ管、扁桃腺など) や血液中に存在するリンパ球の内の大リンパ球に属するリンパ球を指す。



- 2 1 -

本願明細書中で用いられる「活性化リンパ球」なる用語は、例えば下記のようなリンパ球を意味するがこの限りではない。例えば、何らかの刺激により活性化されたリンパ球を指す。リンパ球は、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細胞に分類され、さらにT細胞についてはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分類することができる。従って、本発明で言う「活性化リンパ球」には、主に活性化T細胞、活性化B細胞、および活性化ナチュラルキラー細胞が含まれ、さらに活性化T細胞には活性化CD4陽性細胞と活性化CD8陽性細胞が含まれる。

CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカイン（IFN $\gamma$ 、IL-4など）を分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖して活性化される。活性化CD4陽性T細胞とは、このような状態のCD4陽性T細胞を指す。

CD8陽性T細胞は、抗原に反応するとIL-2Rを発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害性をもつCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すようになる。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒の中にはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成されるMACによく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン（proteoglycan）なども含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN $\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。活性化CD8陽性T細胞とは、このような状態のCD8陽性T細胞を指す。

T細胞は汎血球凝集素（植物凝集素、PHA）やコンカナバリンA（Con A）に反応して芽球化現象を示すが、このような状態のT細胞も活性化T細胞に含まれる。

B細胞では、B7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リンフォカインを産生したりし、

- 22 -

刺激を受けて細胞が大きくなったり、増殖を起こすなどの変化が見られる。活性化 B 細胞とは、このような状態の B 細胞を指し、本発明においては、抗体を分泌するようになった B 細胞（抗体分泌細胞(antibody-secreting cell)及び形質細胞(plasma cell)）も活性化 B 細胞に含まれる。

活性化ナチュラルキラー細胞とは、前述のとおり腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害作用を示すナチュラルキラー細胞を指す。なお、本発明においては、コンカナバリン A (Con A) で刺激された胸腺細胞も活性化リンパ球に含まれる。

本発明において用いられる「活性化リンパ芽球細胞」には、前記のような「リンパ芽球」が、コンカナバリン A のような前記「マイトジェン」で刺激を受けて活性化されたリンパ芽球が含まれる。

本願明細書で場合によって用いられる「静止期リンパ球」なる用語は、前述の活性化リンパ球と対照的に、細胞の活性化のための刺激を受けていない非活性化状態のリンパ球を指す。

本発明を構成する「AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生」における「サイトカイン」とは、AILIM を発現する細胞（特に、T 細胞）が産生する任意のサイトカインを意味する。

該 T 細胞は、Th1 タイプの T 細胞及び Th2 タイプの T 細胞が挙げられ、本発明における該サイトカインは、特にそれら Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカイン及び／または Th2 タイプの T 細胞が産生する任意のサイトカインを意味する。

Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF、IL-3 などが挙げられ、また Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインとしては、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10、TNF などが挙げられる（細胞、Vol.30, No.9, p.34 3-346, 1998）。

本発明を構成する「物質」、具体的には「AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物

質」には、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。

ここで、「AILIMを介するシグナル伝達」とは、上述または後述する実施例で詳述するようなAILIMを発現する細胞に任意の表現型の変化（細胞増殖、細胞の活性化、細胞の不活性化、細胞死、及び／またはAILIM発現細胞からの任意のサイトカインの産生能の変化）をもたらすようなAILIMを通じたシグナル伝達を意味する。

該「物質」は、「蛋白性物質」と「非蛋白性物質」に大別することができる。

該「蛋白性物質」としては、後述するポリペプチド、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部）が挙げられる。

該物質が抗体である場合には、好ましくはモノクローナル抗体である。該物質がモノクローナル抗体である場合には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、後述する組換えキメラモノクローナル抗体、組換えヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が包含される。

該物質が、ポリペプチドである場合には、後述するポリペプチド、該ポリペプチドの断片（オリゴペプチド）、融合ポリペプチド、及びそれらいずれかの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

該ポリペプチドの具体例としては、後述する下記が挙げられる。

- (1)AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- (2)AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；または、
- (3)AILIMに結合するポリペプチド。

- 24 -

該「非蛋白性物質」としては、DNA、RNA及び化学的に合成された化合物が挙げられる。

ここで、「DNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするDNA（cDNA及びゲノミックDNAを含む）の塩基配列を基に設計されるアンチセンスDNA医薬として有用な「該DNAの部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」を意味する。即ち、該アンチセンスDNAは、AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、該DNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び/または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修

- 25 -

飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

ここで、「RNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするRNAの塩基配列を基に設計されるアンチセンスRNA医薬として有用な「該RNAの部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」を意味する。該アンチセンスRNAは、AILIMをコードするDNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

該アンチセンスRNAは、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンスDNAに適用されるような化学修飾を挙げることができる。

「化学的に合成された化合物」とは、上述のDNA、RNA及び蛋白性物質を除く任意の化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」とは、AILIM（好ましくはヒトのAILIM）を構成するポリペプチド鎖の一部（断片）を意味し、好ましくはAILIMを構成するポリペプチドの細胞外領域の全部またはその一部を意味する

- 26 -

(該領域は所望応じそのN末端及び／またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。 )。

本発明に係るAILIMは、1または2のポリペプチド鎖により構成される細胞膜を貫通する細胞膜貫通分子である。

ここで「細胞膜貫通蛋白」とは、多くの受容体あるいは細胞膜表面分子に見られるように、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとる蛋白を指す。さらにそのような膜貫通性蛋白は、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(oligomer)を形成して存在することにより、各々の受容体や細胞表面分子を構成する。

ここで「細胞外領域」とは、前述のような細胞膜膜貫通蛋白の全体構造のうち、該膜蛋白が連結している膜の外界側に存在する部分構造(部分領域)の全部または一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域(膜貫通領域)及び該膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域(細胞内領域)以外の領域の全部または一部を意味する。

前述の「蛋白性物質」に包含される「融合ポリペプチド」とは、AILIM(好ましくはヒトのAILIM)を構成するポリペプチドの細胞外領域の全部または一部と「免疫グロブリン(Ig、好ましくはヒトのIg)の重鎖の定常領域の全部または一部」とからなる融合ポリペプチドである。好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる領域(Fc)との融合ポリペプチドである。なお、IgGとしては、

- 27 -

IgG1 が好ましい。また、AILIM としては、ヒト、マウスまたはラット（好ましくはヒト）の AILIM が好ましい。

ここで「免疫グロブリン (Ig) の重鎖の定常領域の全部または一部」とは、好ましくはヒト由来の免疫グロブリンの重鎖 (Heavy Chain, H鎖) の定常領域 (Constant region)、Fc 領域またはそれらの一部を意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG (IgG1、IgG2、IgG3 及び IgG4)、IgM、IgA (IgA1 及び IgA2)、IgD 及び IgE を挙げることができる。好ましくは、IgG (IgG1、IgG2、IgG3 若しくは IgG4)、または IgM である。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来の IgG (IgG1、IgG2、IgG3 若しくは IgG4) に属する免疫グロブリンである。

免疫グロブリンは、2つの相同な軽鎖 (Light Chain, L鎖) と2つの相同な重鎖 (Heavy Chain, H鎖) の4つの鎖が、ジスルフィド結合 (S-S結合) で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) 及び軽鎖定常領域 ( $C_L$ ) から構成される。重鎖は、重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と重鎖定常領域 ( $C_H$ ) から構成される。

重鎖定常領域は、クラス (IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE) 並びにサブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2) 毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。

IgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4) の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインから構成される。

同様に IgG1 の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_1 1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_1 2$ ドメイン及び $C\gamma_1 3$ ドメインから構成される。IgG2の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_2 1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_2 2$ ドメイン及び $C\gamma_2 3$ ドメインから構成される。IgG3の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma$

- 28 -

$\gamma_3$  1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_3$  2ドメイン及び $C\gamma_3$  3ドメインから構成される。IgG 4の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_4$  1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_4$  2ドメイン及び $C\gamma_4$  3ドメインから構成される。

IgAの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha$  1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha$  2ドメイン及び $C\alpha$  3ドメインから構成される。

同様にIgA 1の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha$  1 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha$  1 2ドメイン及び $C\alpha$  1 3ドメインから構成される。IgA 2の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha$  2 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha$  2 2ドメイン及び $C\alpha$  2 3ドメインから構成される。

IgDの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\delta$  1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\delta$  2ドメイン及び $C\delta$  3ドメインから構成される。

IgMの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\mu$  1ドメイン、 $C\mu$  2ドメイン、 $C\mu$  3ドメイン及び $C\mu$  4ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

IgEの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\epsilon$  1ドメイン、 $C\epsilon$  2ドメイン、 $C\epsilon$  3ドメイン及び $C\epsilon$  4ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

さらに、IgGを例に挙げるならば、IgGをババインで処理すると、2つの重鎖を連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のややN末端側で切断されて、 $V_H$ 及び $C_H$  1からなる重鎖断片と1つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した2つの相同なFab、並びにヒンジ領域、 $C_H$  2ドメイン及び $C_H$  3ドメインからなる2つの相同な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した1つのFcを生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第2版、第65～75頁、1992年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第4～7頁、1991年、南江堂発行など参照）。



即ち、上述の「免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の定常領域一部を意味し、好ましくは、C1ドメインを欠く定常領域またはFc領域である。具体的には、IgG、IgAまたはIgDの場合には、各々のヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなる領域が挙げられ、IgMまたはIgEの場合には、各々のC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のIgG1のFc領域を挙げることができる。

上述の融合ポリペプチドは、前述のようなIgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部（例えば、Fc）を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティークラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」には、また「AILIMに結合するポリペプチド」が包含される。

「AILIMに結合するポリペプチド」としては、具体的には、AILIMと相互作用するリガンドである既知のB7h、B7RP-1、GL50あるいはLICOSと称される分子（Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000）を構成するポリペプチドの全部または一部を含むポリペプチドが挙げられる。

好ましくは、上記リガンド（B7h、B7RP-1、GL50、LICOS）の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド、または該ポリペプチドと免疫グロブリン（好ましくはヒト免疫グロブリン）の重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合

ポリペプチドである。ここで、「細胞外領域」及び「免疫グロブリンの重鎖の定常領域」なる用語については、上述と同様の意味を有する。

上述したポリペプチド、該ポリペプチドの一部（断片）及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明における「抗体」とは、前記で定義した哺乳動物の AILIM（特に好ましくはヒト AILIM）に対するポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、AILIM に結合し AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM に結合し AILIM 発現細胞によるインターフェロン $\gamma$ 若しくはインターロイキン 4 の産生を抑制する活性を有する抗体である。

本発明の「抗体」は、本発明の AILIM を発現する細胞（天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など）、AILIM をその細胞表面に高発現するように遺伝子組換え技術を用いて作製された形質転換体、AILIM を構成するポリペプチド、該 AILIM ポリペプチド、または AILIM の細胞外領域を含む前述の融合ポリペプチドを抗原として用い、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted 抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

モノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgD あるいは IgE 等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体もが包含される。好ましくは、IgG または IgM である。

ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動

- 3 1 -

物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー（Nature）、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラ

- 3 2 -

ット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-AG8.653 (653)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP 2/0-Ag14 (Sp2/0、Sp2)、PAI、FO あるいは BW5147、ラット由来ミエローマ 210 RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマ U-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CE M-AGR、D1R11 あるいは CEM-T15 を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えば R I A や E L I S A 等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F12 培地、MCDB153 培地あるいは低カルシウム MEM 培地等の低カルシウム培地及び MCDB104 培地、MEM 培地、D-MEM 培地、RPM I1640 培地、ASF104 培地あるいは RD 培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、

- 33 -

該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

「組換えキメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

組換えキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性化V<sub>H</sub>遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得したCH遺伝子（H鎖定常領

- 3 4 -

域をコードするC遺伝子)を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>L</sub>遺伝子(L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子)の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>L</sub>遺伝子(L鎖定常領域をコードするC遺伝子)を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素(例えばEcoRI、Hind III等)を用いて消化し、電気泳動に付して(例えば0.7%アガロースゲル使用)サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイクン(75℃、3時間)を行う。ベイクン終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間(例えば、2×SSC/0.1%SDS溶液、室温、10分間)のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定した

- 35 -

DNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、 $\lambda$ EMBL3、 $\lambda$ EMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（ $\kappa$ ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンデイス法（Science、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV<sub>H</sub>(VDJ)遺伝子あるいはV<sub>L</sub>(VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒトC<sub>H</sub>遺伝子及びヒトC<sub>L</sub>遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、C<sub>H</sub>遺伝子であるC $\gamma$ 1遺伝子とC<sub>L</sub>遺伝子であるC $\kappa$ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトC $\gamma$ 1遺伝子及びヒトC $\kappa$ 遺伝子に相当するマウスC $\gamma$ 1遺伝子及びマウスC $\kappa$ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には、例えば、クローンIg146（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第75巻、第4709～第4713頁、1978年）からの3kbのHind III-BamHI断片とクローンMEP10（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第78巻、第474～第478頁、1981年）からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのHae III-AluIゲノムライブラリー（Cell、第15巻、第1157～第1174頁、1978年）中から、ヒトC $\kappa$ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC $\gamma$ 1遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHind IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドを $\lambda$ 788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

- 36 -

このようにして単離されたマウス  $V_H$  遺伝子とマウス  $V_L$  遺伝子、及びヒト  $C_H$  遺伝子とヒト  $C_L$  遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウス  $V_H$  遺伝子の下流にヒト  $C_H$  遺伝子を、またマウス  $V_L$  遺伝子の下流にヒト  $C_L$  遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えば pSV2gpt あるいは pSV2neo 等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス  $V_H$  遺伝子／ヒト  $C_H$  遺伝子とマウス  $V_L$  遺伝子／ヒト  $C_L$  遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えば P3X63・Ag 8・653 細胞あるいは SP210 細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted 抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である 3 つの領域 (Complementarity-determining residue ; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域と



- 37 -

は、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework region ; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明においては、該ヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

ヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を

- 38 -

同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体）は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平 4-504365 号公報; 特表平 7-509137 号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; 国際出願公開 W094/25585 号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平 6-500233 号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中からヒト由来タンパクを製造方法を適用することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部の領域を意味し、具体的には  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、 $sFv$ 、 $dsFv$  (disulphide stabilized  $Fv$ ) あるいは  $dAb$  (single

domain antibody) などを意味する (Exp. Opin. Ther. Patents, 第6巻, 第5号, 第441~456頁, 1996年)。

ここで、「F(ab')<sub>2</sub>」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはババイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをババインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてV<sub>L</sub> (L鎖可変領域) とC<sub>L</sub> (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びV<sub>H</sub> (H鎖可変領域) とC<sub>H</sub>γ1 (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab' という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')<sub>2</sub> という。

本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される「物質」、具体的には「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質」並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物である。具体的には、前記で定義した「蛋白性物質」若しくは「非蛋白性物質」、並びに薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。さらに具体的には、前記に定義したポリペプチド、該ポリペプチドの一部 (断片)、融合ポリペプチド、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体若しくは該モノクローナル抗体の一部のいずれかと薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記ポリペプチドや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき  $10\mu\text{g}$  から  $1000\text{mg}$ （あるいは  $10\mu\text{g}$  から  $500\text{mg}$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に  $0.1\mu\text{g}$  抗体/ $\text{ml}$  担体 $\sim 10\text{mg}$  抗体/ $\text{ml}$  担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において  $1\text{kg}$  体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$  の割合で、好ましくは  $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$  の割合で、1日あたり1回 $\sim$ 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

- 4 1 -

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、脾炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、炎症性腸疾患、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、細菌やウイルスによる感染により惹起される種々の症状（例えば、炎症）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、種々の皮膚疾患（例えば、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、乾癬、強皮症）、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。

本発明における「炎症」には、急性炎症及び慢性炎症のいずれもが含まれる。

一般に急性炎症とは、炎症反応が比較的急速に発現し進行が速く、その終了が明確な炎症である。一方、慢性炎症とは、炎症反応が比較的ゆっくりあるいは

徐々に発現し、あるいはその発現の存在すら不明確な程度に発現し、数週間乃至数年間にわたり持続され、その終了も不明確な炎症である。

また、本発明における炎症には、任意の組織で起こる炎症もが包含される。具体的には、脳、眼、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、胃、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻粘膜あるいは関節などの組織における炎症が含まれる。

本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、正常マウス胸腺由来 T 細胞における CD3、CD28 及び AILIM (ThA と別称する) の発現状態を示す図。

分図 (a) は CD3 及び AILIM (ThA と別称する) の発現状態を示す。分図 (b) は CD3 及び CD28 の発現状態を示す。

図 2 は、正常マウス胸腺由来 T 細胞での CD28 及び AILIM の発現状態を、CD4 及び CD8 の発現を指標とした T 細胞の分化の各段階毎に示す図。

R2 乃至 R8 は、各々下記を示す。

R2 : CD4 陰性 CD8 陰性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R3 : CD4 弱陽性 CD8 弱陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R4 : CD4 陽性 CD8 陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R5 : CD4 陽性 CD8 弱陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R6 : CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R7 : CD4 弱陽性 CD8 陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

R8 : CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞での AILIM 及び CD28 の発現状態。

図 3 は、正常マウス脾臓組織に含まれる CD4 陽性 T 細胞における AILIM の発現状態を示す図。

- 4 3 -

図4は、肝炎を罹患した宿主の肝臓組織浸潤CD4陽性T細胞におけるAILIMの発現状態を示す図。

図5は、関節リウマチ患者の末梢血中T細胞及び関節腔浸潤T細胞の各々に含まれるCD4陽性T細胞及びCD4陰性T細胞の各々におけるAILIM及びCD28の発現状態を示す図。

図6は、種々の刺激剤で刺激して活性化した正常マウスのリンパ組織由来T細胞における、AILIMの発現状態を経時的に示す図。

図7は、マウスの各種T細胞株及びT細胞由来ハイブリドーマでのAILIMの発現状態並びに他の種々の性状を概略的に示す図。

図8は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いて再現したCD3とAILIMのクロスリンクによる、マウス脾臓由来T細胞の活性化能（IFN $\gamma$ の産生誘導能）を示す図。

図9は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いて再現したCD3とAILIMのクロスリンクによる、ラット脾臓由来T細胞の活性化能（IFN $\gamma$ 産生誘導能）を示す図。

図10は、抗CD3抗体と抗AILIM抗体をコーティングしたプレートを用いて再現したCD3とAILIMのクロスリンクによる、ヒト末梢血由来T細胞の活性化能（IFN $\gamma$ 産生誘導能）を示す図。

図11は、抗CD3抗体による刺激により活性化したヒト末梢血由来T細胞における、T細胞反応の1つであるIFN- $\gamma$ の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

図12は、抗CD3抗体による刺激により活性化したヒト末梢血由来T細胞における、T細胞反応の1つであるIL-4の産生の上昇に対する抗AILIM抗体による抑制効果を示す図。

- 4 4 -

図 1 3 は、抗 CD3 抗体による刺激により活性化したマウス胸腺由来 T 細胞における、T 細胞反応の 1 つである IL-4 の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 4 は、抗 CD3 抗体による刺激により活性化したマウス脾臓由来 T 細胞における、T 細胞反応の 1 つである IL-4 の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 5 は、関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗 AILIM 抗体の複数回投与による治療効果を示す図。

図 1 6 は、肝炎宿主における病状悪化のパラメーターである IFN- $\gamma$  の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による治療効果を示す図。

図 1 7 は、肝炎宿主における病状悪化のパラメーターである GPT 及び GOT の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 8 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである IgG の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 1 9 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである IgE の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 2 0 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである抗 dsDNA 抗体価の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 2 1 は、外来抗原である SRBC で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の産生の抗 AILIM 抗体 (抗原感作直後に投与) による抑制効果を示す図。

図 2 2 は、外来抗原である SRBC で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する抗体の産生の抗 AILIM 抗体 (抗原感作 7 日目に投与) による抑制効果を示す図。

図 2 3 は、正常組織 (胸腺、リンパ節及び末梢血) 並びに病変部位での AILIM の発現状態、並びに CD28 の発現状態を模式的に示す図。



- 4 5 -

図 2 4 は、健常人末梢血由来 T 細胞及び該 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM、CD28、CD4、CD8、CD19、及び CTLA-4 の各々の発現状態を示す図。

分図(a)は、末梢血由来 T 細胞の種々細胞の分布を示す。

分図(b)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞の分布を示す。

分図(c)は、末梢血由来 T 細胞における CD4 及び CD8 の発現状態を示す。

分図(d)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における CD4 及び CD8 の発現状態を示す。

分図(e)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CD4 の発現状態を示す。

分図(f)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CD4 の発現状態を示す。

分図(g)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CD28 の発現状態を示す。

分図(h)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CD28 の発現状態を示す。

分図(i)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CTLA-4 の発現状態を示す。

分図(j)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CTLA-4 の発現状態を示す。

分図(k)は、末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CD19 の発現状態を示す。

分図(l)は、末梢血由来 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞における AILIM 及び CD19 の発現状態を示す。

図 2 5 は、健常人末梢血に由来する T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、該各々の T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す図。

分図(a)は、末梢血 T 細胞及び該 T 細胞から分離した AILIM 陽性細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す。

分図(b)は、末梢血 CD4 陽性 T 細胞及び該 T 細胞から分離した CD4 陽性 AILIM 陽性 T 細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す。

分図(c)は、末梢血 CD8 陽性 T 細胞及び該 T 細胞から分離した CD8 陽性 AILIM 陽性 T 細胞の各々における AILIM の発現の強さを示す。

図 2 6 は、慢性関節リウマチ (RA) 及び変性性関節炎 (OA) に罹患している患者の各々の末梢血由来 T 細胞及び関節腔液由来 T 細胞、並びに進行性全身性硬化症 (強皮症 ; PSS) 、及び全身性エリテマトーデス (SLE) に罹患している患者の各々の末梢血 T 細胞の各々における AILIM の発現状態を示す図。

図 2 7 は、アジュバント誘発関節炎モデルラットの胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血の各々に由来する T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞) における AILIM の発現状態を示す図。

図 2 8 は、各種の刺激で活性化させた健常人末梢血由来 T 細胞における AILIM 及び CTLA-4 の各々の発現状態を示す図。

分図(a)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した T 細胞における AILIM の発現の強さを示す。

分図(b)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した T 細胞における CTLA-4 の発現の強さを示す。

分図(c)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した CD4 陽性 T 細胞における AILIM の発現の強さを示す。

分図(d)は、PMA 及び Ionophore の刺激により活性化した CD4 陽性 T 細胞における CTLA-4 の発現の強さを示す。

分図(e)は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激または抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激で活性化した T 細胞における AILIM の発現の強さを示す。

分図(f)は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激または抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激で活性化した T 細胞における CTLA-4 の発現の強さを示す。

図 29 は、種々の抗体の刺激によるヒト末梢血 T 細胞における種々サイトカインの産生誘導能を示す図。

図 30 は、種々濃度の種々の抗体の刺激によるヒト末梢血 T 細胞の細胞増殖誘導能を示す図。

図 31 は、種々抗体の刺激によるヒト末梢血 T 細胞の経時的な細胞増殖誘導能を示す図。

図 32 は、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体をコーティングしたマイクロプレート中での培養におけるマウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞の各々の増殖の程度を示す図。

分図(a)は、マウス脾臓細胞の増殖の程度を示す。

分図(b)は、マウス脾臓由来 T 細胞の増殖の程度を示す。

図 33 は、抗 CD3 抗体（濃度一定）及び抗 AILIM 抗体（各種濃度）をコーティングしたマイクロビーズ（濃度一定）を用いた培養におけるマウス脾臓細胞の各々の増殖の程度を示す図。

図 34 は、抗 CD3 抗体（濃度一定）及び抗 AILIM 抗体（濃度一定）をコーティングしたマイクロビーズ（種々濃度）を用いた培養におけるマウス脾臓細胞の増殖の程度を示す図。

図 35 は、抗 CD3 抗体（濃度一定）及び抗 AILIM 抗体（濃度一定）をコーティングしたマイクロビーズ（種々濃度）を用いた培養におけるマウス脾臓由来 T 細胞の増殖の程度を示す図。

図 36 は、種々濃度の種々の抗体の刺激によるラットリンパ節由来 T 細胞の細胞増殖誘導能を示す図。

図 37 は、関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗 AILIM 抗体の単回投与（濃度一定）による治療効果を示す図。

図 38 は、関節症宿主における関節症のパラメーターである足腫れに対する抗 AILIM 抗体の単回投与（種々濃度）による治療効果を示す図。

図 39 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである IgG の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 40 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである IgE の産生の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 41 は、移植片対宿主病 (GVHD) の移植変対宿主反応 (GVH 反応) の 1 つである抗 dsDNA 抗体価の上昇に対する抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 42 は、外来抗原である NP-KLH で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する IgG1 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 43 は、外来抗原である NP-KLH で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する IgM 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 44 は、外来抗原である NP-KLH で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する IgG1 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 45 は、外来抗原である NP-KLH で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する IgG2b 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 46 は、外来抗原である NP-KLH で免疫感作された宿主の生体での該外来抗原に対する IgG2a 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果を示す図。

図 47 は、健常人「ドナー A」の T 細胞を健常人「ドナー D」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応 (MLR) での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [ $^3\text{H}$ ] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

- 4 9 -

図 4 8 は、健常人「ドナー D」の T 細胞を健常人「ドナー B」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての  $[^3\text{H}]$  チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

図 4 9 は、健常人「ドナー C」の T 細胞を健常人「ドナー A」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての  $[^3\text{H}]$  チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「CD80+86」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「mIgG1」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

図 5 0 は、健常人「ドナー E」の T 細胞を健常人「ドナー G」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応（MLR）での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての  $[^3\text{H}]$  チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

- 50 -

「control mIgG」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

図 5 1 は、健常人「ドナー F」の T 細胞を健常人「ドナー E」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応 (MLR) での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [ $^3\text{H}$ ] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「control mIgG」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

図 5 2 は、健常人「ドナー G」の T 細胞を健常人「ドナー F」の PBMC と培養した場合の混合リンパ球反応 (MLR) での該 T 細胞の増殖試験における、種々の対照被験物質による該 T 細胞の増殖の抑制効果を示す図。

縦軸は細胞増殖の程度の指標としての [ $^3\text{H}$ ] チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は該被験物質の濃度を示す。

なお、図中の各種表記は下記を意味する。

「control mIgG」：抗ヒト CD34/IgG1 マウスモノクローナル抗体。

「CD80+86 Ab」：抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体との混合物。

「SA12」：抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体。

「CTLA4-Ig」：ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子。

発明を実施するための最良の形態

- 5 1 -

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

#### 実施例 1 実験材料の準備

以下に述べる試験で用いた実験材料（動物、抗体、細胞）は特に断りのない限り以下のようにして調製した。

##### <1-1> 動物

C57BL/6 マウス（雄、5 乃至 8 週齢）及び BALB/c マウス（雄、5 乃至 8 週齢）は、日本 SLC（株）より購入した。Wistar ラット（雄、5 乃至 6 週齢）は、日本チャールズリバー（株）より購入した。

##### <1-2> 抗ラット AILIM モノクローナル抗体の調製

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ラット AILIM モノクローナル抗体（マウス抗ラット JTT-1 抗原モノクローナル抗体）を産生する「JTT-1」及び「JTT-2」と各々命名したハイブリドーマ（2つのハイブリドーマは1996年10月11日付でブダペスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に国際寄託されている。<JTT-1>国際寄託番号 FERM BP-5707、及び<JTT-2>国際寄託番号 FERM BP-5708）を *in vitro* または *in vivo* で培養して得られる培養上清または腹水から精製したモノクローナル抗体を以下の試験で用いた（日本国特許出願公開 11-29599 号公報（実施例 1 及び 2）、及び国際特許出願公開 W098/38216 号（実施例 1 及び 2））。

以下、これらのマウス抗ラット AILIM モノクローナル抗体を、各々「JTT-1 抗体」及び「JTT-2 抗体」（IgG1）と呼ぶ。なお、「JTT-1 抗体」及び「JTT-2 抗体」は、各々「JMab49」及び「JMab50」とも別称する。

なお、以下の試験で用いられる抗ラット AILIM 抗体は特に断りのなかりきり

「JTT-2 抗体」（JMab50 と別称 ; IgG1）である。

##### <1-3> 抗ヒト AILIM モノクローナル抗体の調製

- 52 -

以前本発明者が作成し報告したマウス抗ヒト AILIM モノクローナル抗体（マウス抗ヒト JTT-1 抗原モノクローナル抗体）を産生する各々「SA12」及び「SG430」と命名したハイブリドーマ（各々 $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス）を、ICR nu/nu マウス（雌、7乃至8週齢）の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から各々のマウス抗ヒト AILIM モノクローナル抗体を大量調製した（日本国特許出願公開 11-29599 号公報（実施例 1.2）、及び国際特許出願公開 W098/38216 号（実施例 1.2））。

以下、これら 2 種類のマウス抗ヒト AILIM モノクローナル抗体の各々を「SA12 抗体」（IgG1）及び「SG430 抗体」（IgG1）と呼び、以下の試験で用いた

#### <1-4> 抗マウス AILIM モノクローナル抗体の調製

以下のようにして調製した。

以前本発明者らがクローニングしたマウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）（日本国特許出願公開 11-29599 号公報（配列番号 5）、及び国際特許出願公開 W098/38216 号（配列番号 5））の全長アミノ酸配列をコードする cDNA を用いて、遺伝子組換え技術を用いて常法に従ってマウス AILIM を発現する形質転換細胞を調製した。

該形質転換細胞をホモジナイズし、超遠心分離（ $100,000 \times g$ ）して、細胞膜画分を含む遠心残さを回収し、PBS に懸濁させた。得られた細胞膜画分を、完全フロインドアジュバントとともに Wistar ラットのフットパッド内に注射することにより初回免疫（0 日）した。さらに該細胞膜画分抗原を 7 日目、14 日目および 28 日目という間隔でフットパッド内に投与した。最後の免疫から 2 日後にリンパ節細胞を採取した。

該リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞 PAI（JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982）とを 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール 4000（Boehringer Mannheim 製）を用いて細胞融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、1



- 53 -

0%ウシ胎児血清とアミノプテリンを含有する HAT 含有 ASF104 培地（味の素製）中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体のマウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）に対する反応性を、各々の培養上清を、前記組換えマウス AILIM 発現形質転換細胞に反応させた後、FITC 標識抗ラット IgG（Cappel 製）と反応させることにより染色された細胞の蛍光強度を EPICS-ELITE フローサトメーターで測定することにより確認した。この結果、マウス AILIM（マウス JTT-1 抗原）に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを得た。

それらのハイブリドーマの内の 2 つを各々「B10.5」及び「B9B6」と命名した。これらのハイブリドーマの各々（各々  $10^6$  乃至  $10^7$  個/0.5ml/マウス）を、ICR nu/nu マウス（雌、7 乃至 8 週齢）の腹腔内に注射した。10 乃至 20 日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から各々のラット抗マウス AILIM モノクローナル抗体を大量調製した。以下、これらのハイブリドーマ「B10.5」及び「B9B6」の各々が産生するラット抗マウス AILIM モノクローナル抗体を「B10.5 抗体」（IgG2a）及び「B9B6 抗体」（IgG2a）と呼び、以下の試験で用いた。

#### <1-5> リンパ球の調製

マウスを断頭致死させた後、常法に従って胸腺及び末梢リンパ組織（脾臓、リンパ節）を各々採取し、ステンレス製メッシュ上で細切した。得られた細切組織を 10%FCS（ウシ胎児血清）を含有する RPMI1640 培地に懸濁させ細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液（各々  $1 \times 10^7$  乃至  $3 \times 10^7$ /ml）をシャーレに播種し  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 2 時間培養した。培養後、シャーレから注意深く非粘着性細胞を回収し、RPMI1640 培地で洗浄し各種組織構成細胞を取得した。

ラットの胸腺及び末梢リンパ組織（脾臓、リンパ節）の各種組織構成細胞も、前記と同様にして取得した。

ヒト（健常人及び患者）の末梢血 T 細胞は、常法に従い、健常人及び患者の各々から採取したヘパリン採血液をリンホプレップ（Nycomed 製）で分離して末梢血単核球を取得した後、Pan T cell アイソレーションキット（ミルテニ製）を用いて回収した。

#### <1-6> 株化 T 細胞の調製

本発明者らが樹立した各種マウス T 細胞株（D10、MS202、CD28K0、EL-4、2L2、BC3C13）及びマウス T 細胞由来ハイブリドーマ BW5147 に由来する種々マウス T 細胞由来ハイブリドーマ（KV24、D0.11.10、8-4-31、3H10-11、61-21-25、1-2-66、6-13-64）を以下の試験において用いた。

#### 実施例 2 各種組織構成細胞及び各種細胞株での AILIM の発現の解析

動物（マウス、ラットまたはヒト）の正常組織及び病変組織から得られる細胞での AILIM の発現状態の差違、未刺激 T 細胞及び刺激した T 細胞（活性化 T 細胞）での AILIM の発現状態の差違、並びに各種 T 細胞株での AILIM の発現状態の差違を常法に従って細胞染色及びフローサイトメトリー（flow cytometry）によって解析した。

下記試験で得られた結果を基に、AILIM の組織及び細胞での発現パターンを、CD28 の発現のパターンと比較しながら、模式的に示した（図 23）。但し、当該模式図は、単なる例示であり下記試験で得られたデータを限定的に解釈するためには用いられるものではないことは言うまでもない。

#### <2-1> 細胞染色及びフローサイトメトリー（flow cytometry）

細胞染色及びフローサイトメーター（flow cytometer）による解析は特に断りの無い限り下記のようにして行った。

上記のように取得した各種の組織構成細胞、刺激物質（抗 CD3 抗体、ConA、または PMA と ionophore など）で刺激若しくは未刺激の T 細胞、または各種 T 細胞株を、0.5% ウシ血清アルブミン（BSA）及び 5mM の EDTA を含有するリン酸緩衝

- 5 5 -

液 ( $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  を含まない。PBS-) に再分散させた後、下記 (A) または (B) の一次抗体を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させた。

(A) 前記の各種 AILIM 抗体 (抗マウス AILIM 抗体、抗ラット AILIM 抗体、抗ヒト AILIM 抗体) を FITC または PE (ピコエリスリン) で標識した標識抗体。

(B) 未標識の前記の各種 AILIM 抗体 (抗マウス AILIM 抗体、抗ラット AILIM 抗体、抗ヒト AILIM 抗体)。

次いで、細胞を前記リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後、同緩衝液に再分散させた。

なお、一次抗体として未標識の抗 AILIM 抗体 (前記 (B)) を用いた場合には、さらに FITC、PE またはビオチン (Biotin) で標識した抗マウス Ig 抗体または抗ラット Ig 抗体を二次抗体として細胞分散液に加え、上記と同様にして反応させた。

また、二次抗体としてビオチン標識抗体を用いた場合には、PE 標識したストレプトアビジン (Streptavidine; ファーミンジェン製) を細胞分散液に加え同様にして反応させた後、上記リン酸緩衝液に再分散させた。

上記染色により染色された細胞の大きさ及び蛍光強度を FACSsort (Becton Dickinson 製) を用いて測定し、AILIM の発現分布を LysisII 解析ソフトを用いて解析した。

#### <2-2> マウス胸腺組織由来 T 細胞における AILIM の発現の解析

前記<2-1>の方法によりマウスの正常リンパ組織である胸腺から単離した T 細胞における AILIM の発現を解析した。また同時に AILIM の発現様式の、他の分子 (T 細胞への一次シグナル伝達を担う CD3 分子、副刺激シグナル伝達を担う CD28 分子、T 細胞表面マーカーである CD4 及び CD8) の発現との相関性についても同様にして解析した。

結果を、図 1 及び図 2 に示す。この結果下記新たな知見が得られた。

まず、CD3 分子と AILIM 分子との発現の相関性については、AILIM の発現は CD3 の発現が高い細胞で同様に高い発現が認められ、両分子の発現が相関していた

(図 1(a))。一方、前者とは対照的に、コストимуレトリー分子である CD28 の発現は CD3 の発現が高い程その発現が低下していた (図 1(b))。これらの結果から、少なくとも正常胸腺 T 細胞においては、AILIM 及び CD28 の発現様式は、CD3 の発現との相関性の点で比較した場合、互いに相反するものであった。

胸腺 T 細胞の分化及び成熟の段階は、概ね次のとおりのステップを経る。

(1) CD4 陰性 CD8 陰性細胞 (図 2 の R2) から両分子の発現が僅かに認められる CD4 弱陽性 CD8 弱陽性細胞 (図 2 の R3) へ移行。

(2) CD4 弱陽性 CD8 弱陽性細胞 (図 2 の R3) から両分子を完全に発現する CD4 陽性 CD8 陽性細胞 (図 2 の R4) へと分化。

(3) ポジティブセレクションにより CD4 または CD8 いずれか一方の分子の発現が減弱していき (図 2 の R5 または R7)、最終的な CD4 陽性 CD8 陰性 (図 2 の R6) または CD4 陰性 CD8 陽性 (図 2 の R8) への分化、及び成熟の完了。

CD4 陰性 CD8 陰性細胞においては、AILIM 及び CD28 とともに発現が見られず、CD4 弱陽性 CD8 弱陽性細胞になりともに僅かな発現が見られた。CD28 の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性細胞で最大となり、その後の分化、成熟に伴って発現が低下した。

一方、AILIM の発現は、CD4 陽性 CD8 陽性細胞においても僅かしか認められないものの、その後の細胞の分化、即ち、CD4 または CD8 の発現量の低下に伴い増加し、リンパ球のポジティブセレクションが達成される SP 細胞 (CD4 陽性 CD8 陰性細胞または CD4 陰性 CD8 陽性細胞) へ最終分化した時点で最大の発現が認められた。

この結果、AILIM の発現様式は、CD3 だけでなく CD4 及び CD8 の発現との相関性の点においても、CD28 と異なるものであることが明らかとなった。

#### <2-3> マウス正常リンパ組織由来 T 細胞における AILIM の発現の解析

前記方法により、マウスの正常リンパ組織である脾臓及びリンパ節各々の T 細胞における AILIM の発現を解析した。

結果を図 3 に示す。

- 57 -

脾臓組織由来 T 細胞における AILIM 陽性 T 細胞は、胸腺でのそれと比べ少数であり、その比率は約 1 乃至 3 % であった。また、AILIM 陽性細胞のほとんどは、CD4 陽性 CD8 陰性細胞であった。

リンパ節由来 T 細胞における AILIM の発現は、発現様式及び発現細胞の比率とともに、前記脾臓由来 T 細胞でのそれと同様であった。

#### <2-4> マウス肝炎モデル動物の病変組織由来 T 細胞での AILIM の発現の解析

肝炎モデルマウスを下記のように作製した。

C57BL/6 マウスに *P.acnes* (*Propionibacterium acnes* ; 5mg/ml) を含むのリン酸緩衝液 (PBS- ; 0.2ml) 溶液を尾静注した。1 週間後、該マウスに LPS (*Lipopolysaccharide* ; 1.5  $\mu$ g/ml) を含むリン酸緩衝液 (PBS- ; 0.2ml) を静注することにより肝炎を誘導した。このマウスを肝炎モデル動物として用いた。

LPS 投与から 6.5 時間後、肝臓を採取し、前記方法により T 細胞を取得し、AILIM の発現を解析した。

結果を図 4 に示す。

当該肝炎モデルマウスの肝臓組織由来 T 細胞 (単核細胞) における AILIM の発現は極めて高いものであり、T 細胞のほとんどにおいて顕著な発現が認められた。肝炎モデル肝臓由来 T 細胞での AILIM の発現の程度は、正常マウス脾臓由来 T 細胞 (CD4 陽性細胞) 及びリンパ節由来 T 細胞でのそれに比べ著しく高いものであった。

#### <2-5> 健常人の末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現の解析

健常人末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現、並びに健常人末梢血から分離したヒト単核球細胞での AILIM の発現のレベル及び各種細胞表面マーカーの発現をフローサイトメーターにより解析した。健常人の末梢血 T 細胞は、前記方法により取得した。

一方、AILIM を発現している T 細胞 (AILIM 陽性細胞) は、次のとおり取得した。健常人末梢血より分離した単核球の分画を、0.5% BSA 及び 5mM の EDTA を含

む PBS-で分散した後、抗 AILIM 抗体 (SG430 ; 50  $\mu$ g) を加え 4°C で 30 分間反応させた。次いで、同緩衝液で 3 回洗浄後、ヤギ抗マウス IgG を固定化したマイクロビーズ (100 乃至 500  $\mu$ l ; ミルテニ製) を加えて同様の反応を行い、同緩衝液で洗浄した。次いで、細胞を、常法に従い磁気分離カラム操作 (2 回) に供し、AILIM 陽性細胞を回収した。回収した AILIM 陽性細胞を、各種標識抗体または抗 AILIM 抗体により染色し、フローサイトメーターにより解析した。

結果を、図 24 に示す。

末梢血 T 細胞は、主として CD4 陽性 CD8 陰性細胞と CD4 陰性 CD8 陽性細胞に分けられる。FITC 標識抗 AILIM 抗体 (SA12) と抗 CD4 抗体との共染色では、主に CD4 陽性細胞で AILIM の発現が認められた。抗 CD28 抗体との二重染色により、末梢血 AILIM 陽性細胞のほぼ全てが CD28 を発現していることが分かった。また、末梢血 T 細胞における AILIM 陽性細胞の比率は、概ね 0.5 乃至 5% 程度であった。

一方、ヒト末梢血単核球分画から直接分離した AILIM 陽性細胞における表面マーカーの解析の結果から、下記が判明した。

(1) AILIM 陽性細胞の多くが、CD4 陽性 CD8 陰性細胞であった。

(2) AILIM 陽性細胞の中には、僅かに CD4 陰性 CD8 陽性細胞、及び CD4 陰性 CD8 陰性細胞が認められた。

(3) 抗 CD28 抗体との共染色により、AILIM 陽性細胞のほとんどが CD28 を発現しており、AILIM 陽性細胞のほとんどが T 細胞に分類された。

(4) AILIM 陽性細胞の中には、B 細胞表面マーカーである CD19 に対する抗体で染色される細胞が認められたことから、B 細胞にも僅かに AILIM が発現していることが示された。

(5) AILIM 陽性細胞の多くにおいて、コストимуレーター分子である CTLA4 の発現が認められた。

さらに、末梢血 T 細胞及び AILIM 陽性細胞の各々での AILIM の発現レベルについても合わせて検討した。

結果を図 25 に示す。

AILIM 陽性細胞での AILIM の発現を、末梢血 T 細胞でのそれと比べるとピークシフトが認められることから、AILIM 陽性細胞では AILIM に発現レベルが高いことが確認された。

また、同様の比較を CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞の各々について行った結果、いずれの分画においても、同程度の AILIM の発現が認められた。CD8 陽性細胞は、AILIM 陽性細胞の中での比率は少ないものの、同様の AILIM の発現が認められた。

#### <2-6> 各種関節炎または自己免疫疾患に罹患している患者の T 細胞における AILIM の発現の解析

前記方法と同様にして、関節炎（慢性関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）及び変形性関節炎（osteoarthritis; OA）、並びに自己免疫疾患（進行性全身性硬化症（progressive systemic sclerosis; PSS）及び全身性エリテマトーデス systemic lupus erythematosus; SLE）に罹患している患者の T 細胞における AILIM の発現及び AILIM を発現している細胞の比率を分析した。

関節炎患者については、関節腔液及び末梢血の各々から分離した T 細胞を使用した。一方、自己免疫疾患患者からは末梢血から分離した T 細胞を用いた。また、対照として、健常人の末梢血の T 細胞を用いた。

結果を図 5 及び図 26 に示した。

RA 患者の末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現は、CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞（即ち CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞）のいずれにおいても、健常人の末梢血由来 T 細胞における AILIM の発現と比べ有意な差は認められなかった。

しかしながら、RA 患者の関節腔液由来 T 細胞においては、CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞のいずれにおいても AILIM の発現している細胞の比率が有意に上昇していた。特に、CD4 陽性 T 細胞集団においては、AILIM の発現の平均値が約 20% にまで上昇していた。また、RA 患者の関節腔液由来の CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞の各々における AILIM の発現レベルは、健常人の末梢血の由来の C

D4 陽性 T 細胞及び CD4 陰性 T 細胞の各々と比べ有意な上昇が認められた。RA 患者の CD4 陽性 T 細胞においては、CD28 の発現レベルの変化は認められなかった。

一方、OA 患者については、1 例ではあるが、関節腔液由来 CD4 陽性細胞において AILIM 陽性細胞の比率が著しく上昇していた。

自己免疫疾患患者の末梢血由来 T 細胞については、CD4 陰性 T 細胞における AILIM 陽性細胞の比率は健常人のそれに比べ差が認められないものの。PSS 患者由来 CD4 陽性 T 細胞においては健常人に比べ AILIM 陽性細胞の比率が有意に上昇していた。

#### <2-7> アジュバント誘発性関節炎ラットモデルにおける AILIM の発現の解析

流動パラフィン（和光純薬製）にて 10mg/ml の濃度に調製した結核死菌（M. Tuberculosis H37Ra; Difco）をアジュバントとして、1mg/0.1ml/匹の濃度で Wistar ラット（雄、5 週齢、チャールズリバー製）の尾根部に皮内投与して関節炎を誘発させた。プレシズモメーターを用いて両後肢足容積を計測し当該容積を指標として関節炎の発症を確認した。

アジュバントの投与日（0 日）から経時的に胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血を採取し、前記方法に従って T 細胞分散液を調製した。T 細胞を、前記方法により抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体及び抗 AILIM 抗体の各々で染色し、CD4、CD8 及び AILIM の各々の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

なお、対照には、正常ラットの胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血由来の T 細胞を用いた。

結果を図 27 に示す。

胸腺、脾臓及び末梢血の各々に由来する T 細胞については、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても、対照と比べ AILIM の発現の有意な差を認められなかった。

一方、リンパ節由来 T 細胞については、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても、対照と比べ AILIM 陽性細胞の比率が有意に上昇していた。と



りわけ、CD4 陽性 T 細胞においては、アジュバント投与から 5 日目には、AILIM の発現のピークが認められた。

#### <2-8> マウス T 細胞の活性化に伴う AILIM の発現の変化の解析

マウスのリンパ組織から採取した T 細胞を各種条件下で活性化し、T 細胞の活性化に伴う AILIM の発現の変化を解析した。

T 細胞の活性化は、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に分散した T 細胞に、抗 CD3 抗体（最終濃度：1 乃至 10  $\mu$ g/ml）、コンカナバリン A（Concanavalin A; ConA；最終濃度：1 乃至 5  $\mu$ g/ml）、または PMA（phorbol myristate acetate；最終濃度：20ng/ml）と Ca Ionophore（最終濃度：200ng/ml）を加えて刺激することにより行った。該活性化剤の添加から経時的（0、6、12、24、及び 48 時間）に AILIM の発現を解析した。

結果を図 6 に示す。

いずれの活性化の条件においても、刺激後約 3 乃至 6 時間後に AILIM の発現の上昇が認められ、刺激から 12 時間の時点で最大の AILIM の発現が認められた。AILIM の発現は、刺激から約 24 時間以降においても AILIM の高い発現が認められ、刺激後 48 時間の時点でも同程度の発現レベルが持続されていた。

#### <2-9> ヒト T 細胞の活性化に伴う AILIM の発現誘導の解析

前記と同様にして取得した健常人の末梢血由来 T 細胞を、下記(A)及び(B)の方法により活性化することにより T 細胞の活性化に伴う AILIM 及びコスティミュレーター分子である CTLA-4 の各々の発現を解析した。

##### (A) PMA と Ca Ionophore による T 細胞の活性化

10%FCS 含有 RPMI1640 培地に分散した該ヒト T 細胞（ $1 \times 10^5$  個）に、活性化剤として PMA（最終濃度：20ng/ml）及び Ca Ionophore（最終濃度：200ng/ml）を加えて刺激した。活性化剤添加から 8 時間後に、AILIM 及び CTLA-4 の各々の発現をフローサイトメーターにより解析した。

##### (B) 抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体または抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による活性化

- 62 -

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、D-PBS で希釈した (1) 抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/ウェル) 及び抗 AILIM 抗体 (クローン SA12 ; 1 $\mu$ g/ウェル) または (2) 抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/ウェル) 及び抗 CD28 抗体 (クローン CD28.2 ; 1 $\mu$ g/ウェル) を加え、室温で 3 時間反応させることにより、該プレートを各々の抗体でコーティングした。

各プレートに、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に分散したヒト末梢血由来 T 細胞 (1 $\times 10^5$  個/ml、0.1ml/ウェル) を加え、2 乃至 3 日間培養した。細胞を回収し、前記と同様にして AILIM 及び CTLA-4 の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

結果を図 28 に示す。

PMA と Ionophore による T 細胞の活性化においては、刺激後 8 時間後に著しく高い AILIM の発現が誘導された。また、その発現レベルは、同様に誘導される CTLA-4 の発現レベルに比べ極めて高いものであった。さらに、ほとんど全ての T 細胞において AILIM の発現が誘導された。さらに、CD4 と AILIM、または CD8 と AILIM の二重染色試験の結果から、この活性化により、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても AILIM の有意な発現が誘導されることが分かった。

一方、マイクロプレートにコーティングした抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体、または抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による活性化の試験においては、下記の結果が得られた。

(1) 抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞のいずれにおいても顕著な AILIM の発現誘導が認められた。その発現誘導の程度は、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞での発現誘導の程度よりも、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞における発現の程度の方が高いものであった。

(2) 抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞のいずれにおいても CTLA-4 の発現誘導が認

- 63 -

められた。しかしながら、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体により活性化された T 細胞での発現誘導の程度と、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体により活性化された T 細胞における発現の程度とに有意な差は認められなかった。

#### <2-10> 各種 T 細胞株での AILIM の発現の解析

T 細胞株は、主に自然発生的に不死化されるか、または科学的に処理して不死化された T 細胞株、または T 細胞をミエローマ細胞と細胞融合して不死化された T 細胞ハイブリドーマが知られている。また、T 細胞株は、該細胞のサイトカイン産生の特性に従い Th1 型 T 細胞株及び Th2 型 T 細胞株に分類される。

前記<1-6>に記載した各種の既知のマウス T 細胞株における AILIM 及び CD28 の発現を前記と同様にしてフローサイトメーターを用いて解析した。

結果を図 7 に示す。

AILIM は、Th2 型 T 細胞株のサイトカイン産生の性状を有する株化 T 細胞 (D10, MS202, CD28K0, EL-4 など) で構成的な (constitutive) な発現が認められた。また、それらの細胞株での AILIM の発現は、CD28 の発現と同等またはそれ以上に高い発現であった。

一方、Th1 型 T 細胞株では、6-13-64 を除いて CD28 の発現は高いものの、AILIM の発現は認められなかった。

#### 実施例 3 抗 AILIM 抗体による T 細胞反応の制御能の有無の検討

本発明の一部を構成する抗 AILIM 抗体が、T 細胞反応 (IFN- $\gamma$  や IL-4 などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など) を制御 (促進及び/または抑制) する能力を有するか否か、即ち AILIM を介したコスティミュレイトリーシグナル (co-stimulatory signal) の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、該細胞からのサイトカイン (IFN- $\gamma$  及び IL-4) の産生量、並びに該細胞の増殖の程度を指標に解析した。

##### <3-1> 試験方法

- 64 -

試験の目的に応じて、前述で準備した 1 または 2 種類の抗体（抗 CD3 抗体のみ、抗 CD28 抗体のみ、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体、または抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体）を 96 穴マイクロプレートに加え、37°C で 1 時間以上反応させて、該プレートを 1 または 2 の該抗体でコーティングした。プレートを PBS で十分に洗浄した後、前記で調製した胸腺細胞（ $5 \times 10^5$  個/well）、脾臓細胞（ $2 \times 10^5$  個/well）または精製 T 細胞（ $1 \times 10^5$  乃至  $3 \times 10^5$  個/well）を播種した。

抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体プレートへのコーティングする代わりに、いずれかを後に添加する試験においては、該抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体は、プレートへの細胞の播種の後に添加した。また、この試験においては、対照として抗 AILIM 抗体の代わりに、CTLA4-Ig（CTLA4 の可溶性領域と IgFc との融合蛋白）を用いて同様にして試験した。

プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 2 乃至 4 日間培養し、培養上清中のサイトカイン（IFN- $\gamma$  または IL-4）の濃度を常法に従って ELISA で測定した。また、培養後の細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン（<sup>3</sup>H-TdR）取込試験により評価した。

### <3-2> 抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体での T 細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達によるサイトカイン産生の誘導の解析

T 細胞は、T 細胞受容体を介する一次シグナル、及び CD28 や CTLA-4 などのコスティミュレイトリー分子を介する副シグナルを受けることによって特徴的なサイトカインを産生することが知られている。

前記<3-1>の試験方法に従って、マウス、ラット及びヒトの各々から取得した末梢血 T 細胞、胸腺細胞または脾臓細胞を用いて、種々の抗体刺激による種々サイトカイン産生の誘導を解析した。

#### <3-2-1> マウス脾臓由来 T 細胞からの IFN $\gamma$ の誘導

(1) 抗 CD3 抗体（クローン 145-2C11；Pharmingen 製；0 乃至  $3 \mu\text{g/ml}$ ）及び抗 CD28 抗体（クローン CD28.2； $1 \mu\text{g/well}$ ）をコーティングしたマイクロプレー

- 65 -

ト、(2)抗 CD3 抗体及び抗マウス AILIM 抗体 (クローン B10.5 ; 1 $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗 CD3 抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、マウス脾臓由来 T 細胞を加え培養し、培養上清中の IFN $\gamma$  の量を ELISA により測定した。

結果を図 8 に示す。

抗 CD3 抗体のみの刺激では IFN $\gamma$  の産生は誘導されないものの、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による刺激のいずれにおいても IFN $\gamma$  の有意な産生誘導が認められた。また、その産生誘導は、抗 CD3 抗体の濃度に依存して増大した。

#### <3-2-2> ラット脾臓由来 T 細胞からの IFN $\gamma$ の産生誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン G4.18 ; 50ng/well) 及び抗 CD28 抗体 (クローン JJ3 16 ; 1  $\mu$ g/well) をコーティングしたマイクロプレート、(2)抗 CD3 抗体及び抗ラット AILIM 抗体 (クローン JTT1 ; 1 $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗 CD3 抗体のみでコーティングしたマイクロプレート、(4)抗 AILIM 抗体のみでコーティングしたマイクロプレート、及び(5)抗 CD28 抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、ラット脾臓由来 T 細胞を加え培養し、培養上清中の IFN $\gamma$  の量を ELISA により測定した。

結果を図 9 に示す。

抗 CD3 抗体のみ、抗 AILIM 抗体のみ、及び抗 CD28 抗体のみの刺激では、いずれの場合も IFN $\gamma$  の有意な産生は認められないものの、抗 CD3 抗体/抗 AILIM 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体による刺激のいずれにおいても IFN $\gamma$  の有意な産生誘導が認められた。また、その産生誘導は、経時的に増大した。

#### <3-2-3> ヒト末梢血由来 T 細胞からの IFN $\gamma$ の産生誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 一定濃度) 及び抗 AILIM 抗体 (クローン SA1 2 ; 各種濃度) をコーティングしたマイクロプレート、及び(2)抗 CD3 抗体のみでコーティングしたマイクロプレートの各々に、ヒト末梢血由来 T 細胞を加え培養

し、培養上清中の IFN $\gamma$  の量を ELISA により測定した。なお、(2) の試験においては、抗 AILIM 抗体を溶液として細胞添加の後に加えた。

結果を図 10 に示す。

一定濃度の抗 CD3 抗体のみをコーティングしたマイクロプレートに T 細胞を加え、抗 AILIM 抗体を溶液として細胞添加の後に加えた試験においては、抗 AILIM 抗体の濃度を 20  $\mu$ g/ml まで増加させても細胞からの IFN $\gamma$  の産生誘導は認められなかった。

一方、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をともにコーティングしたマイクロプレートで培養したヒト T 細胞からは、抗 AILIM 抗体の濃度が 5  $\mu$ g/ml 以上の場合に、顕著な IFN $\gamma$  の産生誘導が認められた。

また、ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、前記と同様にして抗 AILIM 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養すると、当該 T 細胞からのサイトカインの産生及び細胞増殖が促進された。また、この結果は、ConA または PMA で刺激した末梢血由来 T 細胞を、抗 CD28 抗体及び抗 CD3 抗体の両方をコーティングしたプレート中で培養した場合の結果と同等であった。

<3-2-4> ヒト末梢血由来 T 細胞からの TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-2、IL-4 及び IL-10 の産生誘導

(1) 抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/well) のみをコーティングしたマイクロプレート、(2) 抗 CD28 抗体 (クローン CD28.2 ; 1  $\mu$ g/well) のみをコーティングしたマイクロプレート、(3) 抗ヒト AILIM 抗体 (クローン SA12 ; 1  $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート、(4) 抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体でコーティングしたマイクロプレート、(5) 抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体でコーティングしたマイクロプレート、及び(6) 抗 CD3 抗体、抗 AILIM 抗体及び抗 CD28 抗体でコーティングしたマイクロプレートの各々に、異なる 2 名の健常人ドナーの末梢血から所得した T 細胞の各々を加え培養し、経時的 (18、40 及び 64 時間) に

培養上清中の  $\text{TNF}\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、 $\text{IFN}\gamma$  (interferon- $\gamma$ )、 $\text{IL-2}$  (interleukin-2)、 $\text{IL-4}$  (interleukin-4) 及び  $\text{IL-10}$  (interleukin-10) の各々の量を ELISA により測定した。

なお、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$  及び  $\text{IL-2}$  は、 $\text{Th1}$  型 T 細胞が産生するサイトカインであり、 $\text{IL-4}$  及び  $\text{IL-10}$  は  $\text{Th2}$  型 T 細胞が産生するサイトカインである。

結果を図 29 に示す。下記の結果が得られた。

(1)  $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN}\gamma$  及び  $\text{IL-2}$  の産生誘導については、ドナー間での差違は認められなかった。

(2)  $\text{TNF}\alpha$  及び  $\text{IFN}\gamma$  については、抗 CD3 抗体単独による刺激でも両者の産生誘導が認められた。

(3) 抗 CD3 抗体単独による刺激による  $\text{TNF}\alpha$  及び  $\text{IFN}\gamma$  の各々の産生誘導の程度に比べ、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激のいずれの刺激によっても、 $\text{TNF}\alpha$  及び  $\text{IFN}\gamma$  の各々の産生誘導が相加的に上昇した。

(4)  $\text{IL-2}$  については、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激、並びに抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激により最も高い  $\text{IL-2}$  の産生誘導が認められた。

(5)  $\text{Th2}$  サイトカインである  $\text{IL-4}$  及び  $\text{IL-10}$  については、それらの産生誘導にドナー間の差違が認められた。これは、ヒト個体間での構成 T 細胞の差違を反映している可能性が推察された。

(6)  $\text{IL-4}$  については、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激、並びに抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激により最も高い  $\text{IL-4}$  の産生誘導が認められた。

(7) IL-10 については、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体による刺激、抗 CD3 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激、並びに抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激によりその産生が誘導された。また、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体による刺激により、IL-10 の顕著な産生誘導が認められた。さらに、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体及び抗 AILIM 抗体の 3 抗体による刺激により最も高い IL-10 の産生誘導が認められた。

前記試験の結果は、プレートにコーティングした抗 CD3 抗体が抗原提示細胞上の MHC として働き、同コーティングした抗 AILIM 抗体が AILIM のリガンドとして働き、結果として、加えた T 細胞の細胞内に、T 細胞の活性化に必要な第 1 のシグナルと副刺激シグナル (コスティミュレイトリーシグナル) が伝達されたことを示している。

#### <3-3> CD3 を介したシグナルにより誘導された T 細胞反応としてのサイトカイン産生誘導の抗 AILIM 抗体による抑制

T 細胞を、抗 CD3 抗体をコーティングしたマイクロプレート中で培養することにより誘導される T 細胞反応としての IFN $\gamma$  及び IL-4 の産生誘導を、抗 AILIM 抗体及び抗 CD28 抗体の各々が抑制するか否かを検討した。

抗 CD3 抗体のみをコーティングしたマイクロプレートに、末梢血由来 T 細胞、胸腺由来 T 細胞または脾臓由来 T 細胞を蒔き、次いで抗 AILIM 抗体 (各種濃度)、抗 CD28 抗体 (各種濃度) または CTLA4-IgFc (対照) のいずれかを加え、培養上清中の IFN $\gamma$  または IL-4 の量を前記<3-1>の方法に従って解析した。

結果を図 11、図 12、図 13 及び図 14 に示す。

抗 CD3 抗体による刺激により誘導される末梢血由来 T 細胞からの IFN $\gamma$  及び IL-4 の産生のいずれもが、抗 AILIM 抗体の添加により有意に抑制された (図 11 及び図 12)。また、抗 AILIM 抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、抗 CD28 抗体の添加では、サイトカイン産生の抑制及び細胞増殖の抑制のいずれも認められなかった。



抗 CD3 抗体による刺激により誘導される胸腺由来 T 細胞からの IL-4 の産生は、抗 AILIM 抗体の添加により著しく阻害された (図 13)。また、抗 AILIM 抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、対照としての CTLA4-IgFc の添加によつては、IL-4 産生の有意な抑制並びに細胞増殖の抑制は認められなかった。

抗 CD3 抗体による刺激により誘導される脾臓由来 T 細胞からの IL-4 の産生は、抗 AILIM 抗体の添加により著しく阻害された (図 14)。また、抗 AILIM 抗体の添加により細胞増殖も抑制された。一方、対照としての CTLA4-IgFc の添加によつては、IL-4 産生の有意な抑制及び細胞増殖の抑制は認められなかった。

#### <3-4> 抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体での T 細胞内へのコスティミュレイトリーシグナルの伝達による T 細胞の細胞増殖の誘導の解析

T 細胞は、T 細胞受容体を介する一次シグナル、及び CD28 や CTLA-4 などのコスティミュレイトリー分子を介する副シグナルを受けることによって増殖する。

前記<3-1>の試験方法に従って、健常人の末梢血由来 T 細胞、マウス脾臓細胞、マウス脾臓由来 T 細胞、及びラットリンパ節 T 細胞の各々を用いて、種々の抗体刺激による細胞の増殖の誘導を解析した。

##### <3-4-1> ヒト末梢血由来 T 細胞の増殖の誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン OKT3 ; 200ng/well ; Ortho Diagnostic Systems 製) のみをコーティングしたマイクロプレート、(2)抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体 (クローン CD28.2 ; 種々濃度 ; Pharmingen 製) をコーティングしたマイクロプレート、(3)抗 CD3 抗体 (200ng/well) 及び抗 AILIM 抗体 (クローン SA12; 各種濃度) をコーティングしたマイクロプレート、及び(4)抗 CD3 抗体 (200ng/well)、抗ヒト AILIM 抗体 (種々濃度) 及び抗 CD28 抗体 (1  $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレートの各々に、ヒト末梢血由来 T 細胞を加え培養し、細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン ( $^3$ H-TdR) 取込試験により経時的に評価した。

結果を図 30 に示す。本試験により下記の結果が得られた。

- 70 -

(i) ヒト末梢血由来 T 細胞は、前記(2)乃至(4)のいずれの刺激によっても有意に増殖した。また、該増殖は、プレートにコーティングした抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度に依存するものであった。

(ii) T 細胞の最大増殖誘導活性は、前記(2)乃至(4)のいずれの抗体コーティングプレートによる刺激であってもほぼ同程度であった。

次いで、前記各種抗体の刺激によるヒト末梢血由来 T 細胞の経時的な増殖誘導活性を検討するため、下記(5)、(6)及び(7)のマイクロプレートを用いて前記と同様にして T 細胞の増殖の程度を測定した。

(5)抗 CD3 抗体 (200ng/well) 及び抗 CD28 抗体 (1 $\mu$ g/well) をコーティングしたマイクロプレート、(6)抗 CD3 抗体 (200ng/well) 及び抗 AILIM 抗体 (1 $\mu$ g/well) をコーティングしたマイクロプレート、及び(7)抗 CD3 抗体 (200ng/well)、抗ヒト AILIM 抗体 (1 $\mu$ g/well) 及び抗 CD28 抗体 (1 $\mu$ g/well) でコーティングしたマイクロプレート。

結果を図 31 に示す。

T 細胞の増殖は、いずれの組み合わせの抗体による刺激においても刺激後 18 時間目以降で認められた。抗体による刺激後 40 時間においては、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体との組み合わせによる刺激（前記(5)）において最も強い T 細胞の増殖誘導が認められたものの、当該組み合わせによる T 細胞増殖誘導活性は既に平衡に達していた。

一方、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激（前記(6)）及び 3 種類の抗体による刺激（前記(7)）での T 細胞の増殖誘導活性は、刺激後 60 時間目にピークが認められた。また、これら 2 つの組み合わせによる刺激による刺激後 60 時間目の T 細胞の増殖誘導活性は、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の組み合わせによるそれよりも有意に高いものであった。

<3-4-2> マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞の増殖誘導

<3-4-2-1> 抗体固定化マイクロプレートでの細胞増殖誘導

- 71 -

96 穴マイクロプレートに抗 CD3 抗体 (クローン 145-2C11; Pharmingen 製; 50 ng/well) でコーティングした。次いで、該プレートを各種濃度の抗マウス AILIM 抗体 (クローン B10.5) または対照抗体である抗 NP-KLH 抗体でコーティングした。各々の抗体に、マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞の各々を加え培養し、常法に従ってトリチウム標識チミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) 取込試験により細胞増殖の程度を測定した。

なお、対照抗体である抗 NP-KLH 抗体の調製のための抗原としては、KLH (keyhole limpet hemocyanin、ピアース (PIERCE) 社製) にハプテンである NP (Nitrophenol) を結合させた NP-KLH を用いた。

結果を図 32 に示す。

マウス脾臓細胞及びマウス脾臓由来 T 細胞のいずれも、対照抗体である抗 NP-KLH 抗体の刺激によっては増殖が認められなかった。一方、いずれの細胞においても、抗 AILIM 抗体の刺激により抗 AILIM 抗体の濃度依存的に有意な増殖が認められた。

#### <3-4-2-2> 抗体固定化マイクロビーズでの細胞増殖誘導 (その 1)

抗体を固定化する担体としてマイクロプレートの代わりにラテックスマイクロビーズを用いて前記と同様な細胞増殖試験を行った。

D-PBS 中で、 $1 \times 10^7$  個のビーズあたり、(1)  $1 \mu\text{g/ml}$  の抗 CD3 抗体 (クローン 145-2C11; Pharmingen 製) と各種濃度の抗 AILIM 抗体 (クローン B10.5)、または (2)  $1 \mu\text{g/ml}$  の抗 CD3 抗体と各種濃度の抗 NP-KLH 抗体を加えて 1 時間以上反応させ、D-PBS で洗浄して抗体をビーズに固定化した。

96 穴マイクロプレートを用いて、10% FCS 含有 RPMI1640 培地中に分散させた C57BL/6 マウスの脾臓細胞 ( $1 \times 10^5$ /well) に、該ビーズ ( $1 \times 10^5$  個/well) を加え 56 時間反応させた。反応後の細胞増殖の程度を、常法に従ってトリチウム標識チミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) 取込試験により細胞増殖の程度を測定した。

結果を図 33 に示す。

- 7 2 -

C57BL/6 マウス脾臓細胞は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激、及び抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激のいずれによっても増殖が誘導された。また、細胞増殖の程度は、ビーズに固定化した抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度の増大（抗 CD3 抗体の濃度に対する抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度の比率の増大）に依存して上昇した。また、細胞増殖の程度は、抗 CD3 抗体の濃度と抗 AILIM 抗体の濃度の比率、及び抗 CD3 抗体の濃度と抗 CD28 抗体の濃度の比率がともに 1 : 9 において最大であった。

#### <3-4-2-3> 抗体固定化マイクロビーズでの細胞増殖誘導（その 2）

前記<3-4-2-2>の結果に基づき、抗 CD3 抗体の濃度と抗 AILIM 抗体の濃度の比率、及び抗 CD3 抗体の濃度と抗 CD28 抗体の濃度の比率がともに 1 : 9 の条件で抗体コーティングしたラテックスビーズを用いて、前記と同様にマウス細胞の細胞増殖を解析した。

なお、本試験においては、マウス脾臓細胞の分散液（ $1 \times 10^5$ /well）に加える抗体コーティングマイクロビーズの濃度を各種濃度に設定した。

また、本試験においては、マウス細胞として、BALB/C マウスの脾臓細胞及び BALB/C マウスの脾臓由来 T 細胞の各々を用いた。

また、対照として、抗 CD3 抗体のみを固定化したマイクロビーズを用いて同様にして試験を行った。

結果を図 34 及び図 35 に示す。

BALB/C マウス脾臓細胞及び BALB/C マウス脾臓由来 T 細胞のいずれも、(1)抗 CD3 抗体単独による刺激、(2)抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激、及び(3)抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激のいずれによっても増殖が誘導された。

また、その細胞増殖は、細胞に加えたマイクロビーズの濃度（即ち、抗体の濃度）の増大に依存して上昇した。

BALB/C マウス脾臓細胞及び BALB/C マウス脾臓由来 T 細胞のいずれにおいても、細胞に加えたマイクロビーズの濃度が 30,000 個/well の時に最大の細胞増殖が

- 73 -

誘導された。この結果は、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体をコーティングしたビーズを用いた場合も、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコーティングしたマイクロビーズを用いた場合も同様であった。

#### <3-4-3> ラットリンパ節 T 細胞の増殖誘導

(1)抗 CD3 抗体 (クローン G4.18 ; 50ng/well) と抗 CD28 抗体 (クローン JJ31 9 ; 種々濃度 ; Pharmingen 製) をコーティングしたマイクロプレート、(2)抗 CD3 抗体 (50ng/well) 及び抗 AILIM 抗体 (各種濃度) をコーティングしたマイクロプレート、及び(3)抗 CD3 抗体 (50ng/well) 及び陰性対照抗体 MOPC21 (種々濃度 ; Pharmingen 製) をコーティングしたマイクロプレートの各々に、10%FCS 含有 RPMI1640 培地中に分散したラットリンパ節 T 細胞 ( $1 \times 10^5$  個/well) を加え 37°C で 44 時間培養し、培養終了 6 時間前に 0.5  $\mu$ Ci/well のトリチウム標識チミジン ( $^3$ H-TdR) を加えた。培養後、細胞を回収し、TOPCOUNT (PACKARD 製) にてトリチウム標識チミジン ( $^3$ H-TdR) の細胞への取込量を測定し、該取込量を指標として細胞増殖の程度を解析した。

結果を図 36 に示す。本試験により下記の結果が得られた。

ラットリンパ節 T 細胞は、抗 CD3 抗体単独による刺激のみでは増殖誘導されないものの、抗 CD3 抗体と抗 AILIM 抗体による刺激及び抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激のいずれの刺激によっても有意に増殖した。また、該増殖は、プレートにコーティングした抗 AILIM 抗体または抗 CD28 抗体の濃度に依存するものであった。

#### 実施例 4 抗 AILIM 抗体による関節症の治療効果

##### <4-1> 抗 AILIM 抗体の複数回投与試験

Wistar ラット (雄、5 週齢、チャールズリバー製) に、流動パラフィンで 10mg/ml に調製した結核死菌 (M.Tuberculosis H37Ra; Difco) をアジュバントとして用い、0.1ml/匹の濃度で尾根部に皮内投与し (1mg/0.1ml/匹) 関節症を誘導し

- 74 -

た。アジュバント投与日（0日）から7日後に両後肢足容積をプレシズモメーターで測定し、両後肢足容積を指標に群分けした（各群8匹）。

アジュバント投与日（0日）から7日後に、その内の1群に抗ラット AILIM 抗体（JTT-2 抗体；JMab50 とも別称する；20mg/kg）を静注した。該抗体は、初回投与の後は1週間に2回の割合で初回投与から20日目まで投与した。アジュバント投与から経時的に両後肢足容積をプレシズモメーターで測定した。

なお、アジュバント及び抗体のいずれも投与しない正常ラット群（4匹）、及び陰性対照として抗ラット AILIM 抗体の代わりにマウス抗ヒト CETP 抗体（クローン JHC1；JMab109 とも別称する；日本特許出願公開第 9-20800 号公報）を同様にして投与した群を対照とし、同様にしてプレシズモメーターで両後肢足容積を測定した。

結果を図 15 に示す。

驚くべきことに、抗 AILIM 抗体を投与群では、足腫れが完全に抑制され、関節炎を誘導していない正常ラット群とほぼ同じ結果であった。

#### <4-2> 抗 AILIM 抗体の単回投与試験（その 1）

前記で得た結果に基づき、抗 AILIM 抗体の単回投与による関節炎の治療効果を前記と同様にして検討した。

但し、本試験においては、抗 AILIM 抗体または陰性対照抗体の投与は、アジュバント投与日（0日）から3、5または7日後に、抗ラット AILIM 抗体（JTT-2 抗体；JMab50 とも別称する；20mg/kg）または陰性対照抗ラット CETP 抗体（JHC 1；20mg/kg）を一回のみ静注した。

結果を図 37 に示す。

抗 AILIM 抗体の投与が単回であるにも拘らず、アジュバント投与から3、5及び7日目のいずれの単回投与によっても、足腫れが有意に抑制され、特にアジュバント投与から7日目に抗 AILIM 抗体を投与した群では、足腫れがほぼ 100%抑

- 75 -

制された。この抑制の程度は、関節炎を誘導していない正常ラット群の値とほぼ同じであった。

#### <4-3> 抗 AILIM 抗体の単回投与試験（その 2）

前記<4-2>の結果に基づき、本試験で用いた関節炎モデルにおいて抗 AILIM 抗体が関節炎治療効果を発揮するための抗 AILIM 抗体の用量を前記と同様の方法により検討した。

本試験においては、アジュバント投与から 7 日目に、抗ラット AILIM 抗体（JT T-2 抗体；JMab50 と同別称する）を、1、3、10 または 20mg/kg の濃度で 1 回のみ静注した。

また、比較のため、JTT-2 とは別の抗ラット AILIM 抗体（JTT-1；JMab-49 と別称する；20mg/kg）を同様に単回投与した。

陰性対照については、抗ラット CETP 抗体（JHC1；20mg/kg）を一回のみ静注した。

結果を図 38 に示す。

抗 AILIM 抗体を 1、3、10 または 20mg/kg のいずれの用量で単回投与した場合でも、足腫れがほぼ 100%抑制され、関節炎を誘導していない正常ラットと同様のレベルまで抑制した。また、驚くべきことに、この抑制効果は、極めて低用量である 1mg/kg でも発揮されていた。

#### 実施例 5 抗 AILIM 抗体による肝炎の治療効果

C57BL/6 マウスに、*P.acnes* (*Propionibacterium acnes*) のリン酸緩衝液 (PBS) 溶液を静注した。*P.acnes* 投与 (0 日) から 1 週間後、該マウスに LPS (Lipopolysaccharide) の PBS 溶液を静注し肝炎を誘発した。LPS 投与の 6.5 時間後に眼底より採血し、血漿中の IFN- $\gamma$  の濃度を ELISA により測定した。また、血漿中の GOT (glutamic-oxaloacetic transaminase) 及び GPT (glutamic-pyruvic transaminase) の濃度を生化学検査装置 (Fara) で測定した。

- 76 -

P.acnes 投与（0日）から1、2及び3日目に、抗マウス AILIM モノクローナル抗体（B10.5 抗体；5, 50, 500  $\mu$ g/匹）を腹腔内投与し、抗 AILIM 抗体による肝炎の改善効果を評価した。

なお、抗マウス AILIM 抗体を投与しない群を対照とした。

結果を図 16 及び図 17 に示す。

抗 AILIM 抗体の投与により、抗体濃度依存的に血中の IFN- $\gamma$  の上昇が有意に抑制された。また抗 AILIM 抗体（50  $\mu$ g/匹）を投与した場合に、GOT 及び GPT の上昇が有意に抑制された。

実施例 6 抗 AILIM 抗体による移植片対宿主病（GVHD）の治療効果

#### <6-1> 試験 1

BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを交配して得た F1 マウス（8乃至10週齢、3匹）に、BALB/c マウスの脾臓細胞（ $8 \times 10^7$  個/匹）を静注し GVHD を誘導した。該脾臓細胞投与直後（0時間）及び12時間後の各々に抗マウス AILIM モノクローナル抗体（B10.5 抗体；400  $\mu$ g/匹）を静注し、該脾臓細胞投与の24、48及び72時間後の各々に同 B10.5 抗体（200  $\mu$ g/匹）を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後（0日）、1、2、3及び6週間後の各々に採血し、血清中の IgG1、IgE 及び抗 dsDNA 抗体価を常法により測定した。なお、抗 dsDNA 抗体価の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗 dsDNA 抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗 AILIM 抗体の代わりに、hCTLA4-Ig（ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白）を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗 AILIM 抗体の代わりに PBS を同様にして投与した群を陰性対照とした。

結果を図 18、図 19 及び図 20 に示す。

抗 AILIM 抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH 反応（graft versus host reaction）の指標である血清中の IgG の上昇、IgE の上昇、及び抗 dsDNA



- 77 -

抗体価の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Ig を投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった。

#### <6-2> 試験 2

BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを交配して得た F1 マウス (8 乃至 10 週齢、3 匹) に、BALB/c マウスの脾臓細胞 ( $1 \times 10^8$  個/匹) を静注し GVHD を誘導した。該脾臓細胞投与直後 (0 時間) 及び 12 時間後の各々に抗マウス AILIM モノクローナル抗体 (B10.5 抗体;  $200 \mu\text{g}/\text{匹}$ ) を静注し、該脾臓細胞投与の 24、48 及び 72 時間後の各々に同 B10.5 抗体 ( $100 \mu\text{g}/\text{匹}$ ) を腹腔内投与した。

該脾臓細胞投与直後 (0 日)、1、2、3、6、9 及び 12 週間後の各々に採血し、血清中の IgG1、IgE 及び抗 dsDNA 抗体価を常法により測定した。なお、抗 dsDNA 抗体価の単位は、自己免疫疾患自然発症マウスの血清中の抗 dsDNA 抗体をスタンダードとして標準化した。

また、抗 AILIM 抗体の代わりに、hCTLA4-Ig (ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を同様にして投与した群を陽性対照とした。また、抗 AILIM 抗体の代わりに PBS を同様にして投与した群を陰性対照とした。

結果を図 39、図 40 及び図 41 に示す。

抗 AILIM 抗体を投与した群では、陰性対照群に比べ、GVH 反応 (graft versus host reaction) の指標である血清中の IgG の上昇、IgE の上昇、及び抗 dsDNA 抗体価の上昇が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Ig を投与した陽性対照群の値とほぼ同等であった。

#### 実施例 7 抗 AILIM 抗体による抗外来抗原抗体産生の抑制効果

<7-1> 羊赤血球 (SRBC) で免疫感作したマウスでの抗 SRBC 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果

BALB/c マウス (雌、5 週齢) に、羊赤血球 (SRBC; Sheep red blood cell;  $1 \times 10^8$  個/匹) を静注した。SRBC 投与 (0 日) の直後または SRBC 投与から 7 日後

- 78 -

に抗マウス AILIM モノクローナル抗体 (B10.5 抗体 ; 50 または 500  $\mu$ g/匹) を静注した。SRBC 投与から経時的に採血し血清中の抗 SRBC 抗体の産生量を常法に従って ELISA により測定した。

なお、抗 AILIM 抗体の代わりに、hCTLA4-Ig (ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を同様に投与した群を陽性対照とした。また、抗 AILIM 抗体の代わりに PBS を同様に投与した群を陰性対照とした。

結果を図 21 及び図 22 に示す。

抗 AILIM 抗体を投与した群では、該抗体を SRBC による感作直後投与した群においてもまた 7 日後に投与した群においても、陰性対照群に比べ、外来抗原としての SRBC に特異的な IgG 抗体の産生が有意に抑制された。また、その抑制の効果は、hCTLA4-Ig を投与した陽性対照群の値よりも高いものであった。

一方、hCTLA4-Ig を投与した群では、該 hCTLA4-Ig を SRBC による感作直後に投与した群では、陰性対照に比べ抗 SRBC 抗体の産生が有意に抑制されたものの、SRBC 感作から 7 日後の投与では有意な抑制は見られなかった。

<7-2> NP-KLH で免疫感作したマウスでの抗 NP-KLH 抗体の産生の抗 AILIM 抗体による抑制効果

C57BL/6 マウスに、CFA (完全フロイドアジュバント) 及び NP-KLH (KLH (keyhole limpet hemocyanin) にハプテンである NP (Nitrophenol) を結合させたもの。100  $\mu$ g/マウス) を腹腔内投与した。該抗原の投与の直後 (0 時間) 及び 12 時間後の各々に、抗マウス AILIM 抗体 (クローン B10.5 または B9.B6 のいずれか ; 200  $\mu$ g/マウス) を尾静脈に投与した。また、該抗原投与から 24 及び 48 時間後の各々に該抗 AILIM 抗体のいずれかを腹腔内投与した。

NP-KLH 投与から経時的に採血し血清中の NP-KLH に特異的な抗体 (IgG1、IgG2a、IgG2b 及び IgM の各々) の産生量を常法に従って ELISA により測定した。な

- 79 -

お、該 ELISA には、NP を結合させた牛血清アルブミン (BSA) をキャプチャー抗原として用いた。

なお、陰性対照としては、リン酸緩衝液を用い、また陽性対照としては、hCTL A4-Ig (ヒト CTLA4 の可溶性領域と免疫グロブリンの定常領域とからなる融合蛋白) を用いて上記と同様にして試験した。

結果を図 42、図 43、図 44、図 45 及び図 46 に示す。

陰性対照抗体の投与群では、抗 NP-KLH 抗体の産生が経時的に上昇しており、該陰性対照抗体は抗 NP-KLH 抗体の産生を抑制しなかった。

一方、抗 AILIM 抗体投与群では、抗 NP-KLH 抗体の産生もが有意に抑制され、この抑制効果は、陽性対照である CTLA4-IgFc による抗 NP-KLH 抗体の抑制効果とほぼ同じであった。

また、抗 AILIM 抗体投与群では、IgG1、IgG2a、IgG2b 及び IgM のいずれの抗体クラスに属する抗 NP-KLH 抗体の産生もが有意に抑制された。

#### 実施例 8 抗 AILIM 抗体の混合リンパ球反応 (MLR) の制御活性の解析

抗 AILIM 抗体が、T 細胞反応 (IFN- $\gamma$  や IL-4 などのサイトカインの産生、及び細胞増殖など) を制御 (促進及び/または抑制) する能力を有するか否か、即ち AILIM を介したコスティミュレイトリーシグナル (co-stimulatory signal) の細胞内への伝達の制御能を有するか否かを、アロジェニック混合リンパ球反応 (allogenic mixed lymphocyte reaction; allogenic MLR) における T 細胞の増殖 (即ち、細胞内での DNA 合成) を制御する活性の有無を指標に解析した。

##### <8-1> ヒト PBMC 及び T 細胞の調製

健常人 (7 人; ドナー A, B, C, D, E, F 及び G) の各々から採取した各々の末梢血 (200ml) を、マイクロチューブ (50ml; Falcon 製) に分注した Lymphoprep (15ml; Nycomed 製) に重層した。次いで、遠心分離 (1600 回転、10 分) の後、中間層を回収した。回収した細胞を、リン酸緩衝液で 2 倍以上に希釈した後、遠心分離 (1,800 回転、10 分) して、PBMC (末梢血単核球細胞;  $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$  細

- 80 -

胞)を調製した。血球計数板を用いて細胞数を計数し、MLR試験に必要な細胞数( $1.08 \times 10^8$ 細胞/9マイクロプレート)を分取し、氷上に保存した。残りの細胞は、以下のT細胞の分離に用いた。

PBMCからのT細胞の分離には、PanT Isolationキット(Miltenyi Biotech製)を用いた。該キットの添付の実験操作マニュアルに従って、該残りのPBMCを、該キットに付属の溶液に添加し、反応させた。次いで、細胞を5mMのEDTA及び0.5%BSA含有PBSで洗浄した後、該PBS中に再懸濁した。次いで、該細胞懸濁液を、該PBSで膨潤させたPositive Selection Column VS+(Miltenyi Biotech製)に添加し、非吸着画分を回収した。また、該カラムに該PBSを添加して、洗浄液を回収した。同様の操作を再度行った。回収液を併せて、T細胞画分とした。該T細胞画分を、遠心した後、該PBS中に再懸濁した。得られたT細胞の細胞数を、血球計数板を用いて計数し、以下の試験に用いた。

#### <8-2> 混合リンパ球反応 (MLR)

先に述べたとおり、T細胞等のリンパ球の活性化に必要なコスティミュレトリースIGNALの伝達経路には、既に比較的十分な解析がなされているCD28とCD80(B7-1)/CD86(B7-2)との間のシグナル伝達経路、及びCTLA4とCD80(B7-1)/CD86(B7-2)との間のシグナル伝達経路の2つの経路が知られている。

即ち、混合リンパ球反応(MLR)におけるT細胞の増殖は、該既知の2つの経路を介するシグナル伝達によっても誘導される。

従って、本試験では、下記の被験物質を用いて、(1)CTLA4を介するシグナル伝達経路の遮断によるMLRの抑制、(2)CD80(B7-1)/CD86(B7-2)を介するシグナル伝達経路の遮断によるMLRの抑制、及び(3)AILIMが担う第3のシグナル伝達経路の遮断によるMLRの抑制の各々について解析した。

下記を、被験物質として用いた。

(1) 抗ヒトAILIMマウスモノクローナル抗体SA12(前記実施例に同じ)。

(2) マウスIgG抗体(抗ヒトCD34;陰性対照;Immunotech製)。

- 8 1 -

(3) 抗ヒト CD80 モノクローナル抗体 (Pharmingen 製) と抗ヒト CD86 モノクローナル抗体 (Pharmingen 製) との混合物。

(4) ヒト CTLA4-IgFc キメラ分子 (Ancell 製)。

前記<8-1>で得た各ドナーから調製した PBMC 及び T 細胞を用いて、下記の 6 通りの組み合わせによる混合リンパ球反応 (MLR) を行った。

- (i) T 細胞 (ドナーA) / PBMC (ドナーD)
- (ii) T 細胞 (ドナーD) / PBMC (ドナーB)
- (iii) T 細胞 (ドナーC) / PBMC (ドナーA)
- (iv) T 細胞 (ドナーE) / PBMC (ドナーG)
- (v) T 細胞 (ドナーF) / PBMC (ドナーE)
- (vi) T 細胞 (ドナーG) / PBMC (ドナーF)

試験に用いる PBMC 及び T 細胞は、下記の濃度に調整した。

PBMC を PBS 中に分散した後、培養皿 (60mm) 移し、放射線照射装置 (日立メディコ製) で X 線照射 (50Gy) した。細胞を回収して遠心した後、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に加え、細胞数を、 $2 \times 10^5$  細胞/50 $\mu$ l に調整した。

また、上記で得た各々のドナーからの T 細胞を、10%FCS 含有 RPMI1640 培地に加え、細胞数を、 $1 \times 10^5$  細胞/50 $\mu$ l に調整した。

#### <8-2-1> MLR に対する抗 AILIM 抗体による MLR の抑制

96 穴 U 底マイクロプレートの各ウェルに 10%FCS 含有 RPMI1640 培地を加えた後、10%FCS 含有 RPMI1640 培地で各種濃度に希釈した抗ヒト AILIM マウスモノクローナル抗体 SA12 の溶液を加えた (最終濃度: 0、0.31、1.25、5 及び 20 $\mu$ g/ml)。次いで、T 細胞 (50 $\mu$ l) を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター (NAPCO 製) 内で、37°C で 1 時間培養した。反応終了後、別のドナー由来の PBMC (50 $\mu$ l) を加え、MLR を開始させた。

なお、被験物質として抗ヒト AILIM 抗体以外を用いた場合の MLR は、PBMC と該被験物質との培養の後に、別のドナー由来の T 細胞を加えて反応を行った。

- 82 -

培養の5日目に、各ウェルに、10%FCS含有RPMI1640培地で希釈したトリチウム標識チミジン ( $^3\text{H}$ -Thymidine;  $20\mu\text{l}$ ;  $1\mu\text{Ci/well}$ ) を添加した後さらに1日培養して。培養後、Cell Harvester (Packard 製) を用いて細胞を回収し、 $\beta$  カウンター (TOP COUNT; Packard 製) を用いて、細胞に取込まれている  $^3\text{H}$  の放射活性を測定し、培養後の T 細胞の増殖の程度を解析した。

結果を図 47、図 48、図 49、図 50、図 51、及び図 52 に示す。

この結果、下記が明らかとなった。

(1) CTLA4-IgFc は、CTLA-4 を介するシグナル伝達を遮断することによりアロジェニック MLR による T 細胞の増殖を抑制する。

(2) 抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体は、CTLA4 及び CD28 のリガンドである CD80/CD86 を介するシグナル伝達を阻害することによりアロジェニック MLR による T 細胞の増殖を抑制される。

(3) CTLA4-IgFc、抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体と同様に、ヒト AILIM に対する抗体が抗体濃度依存的に、AILIM を介するシグナル伝達によるアロジェニック MLR での T 細胞の増殖を有意に抑制する。

(4) 抗 AILIM 抗体による MLR の抑制は、いずれのドナー由来の PBMC 及び T 細胞での組合わせにおいても有意に認められる。

この結果は、即ち、T 細胞の活性化に必要なコスティミュレイトリーシグナルの伝達経路には、既知の CTLA4/CD80/CD86 を介する経路及び CD28/CD80/CD86 を介する経路の他に、AILIM とそのリガンドを介する第 3 の経路が存在すること、並びに該 AILIM を介するシグナル伝達経路が、AILIM に対する抗体により阻害されることを示すものである。

さらに、該シグナル伝達における AILIM を介する経路の貢献度は、CTLA4/CD80/CD86 を介する経路及び CD28/CD80/CD86 を介する経路のそれと同程度である可能性が示された。

### 産業上の利用の可能性

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する下記に挙げるような種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に有用である。

該疾患としては例えば、関節症（例えば、関節リウマチ、変形性関節症など）、炎症（例えば、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、膵炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎（糸球体腎炎など）、関節炎（関節リウマチなど）、虚血後再灌流障害（心筋虚血再灌流障害など）における炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、炎症性腸疾患、火傷、多発性臓器障害における炎症、PTCA や PTCR の術後における炎症、及び動脈硬化症に伴う炎症など）、細菌やウイルスによる感染により惹起される種々の症状（例えば、炎症）、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応、組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応、外来抗原による免疫感作により惹起される該抗原に対する抗体の過剰産生を伴う種々の疾患、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、種々の皮膚疾患（例えば、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、乾癬、強皮症）、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。

また、本発明の医薬組成物に含まれる AILIM に対するヒト抗体を含んでなる医薬組成物は、マウス由来の抗体をヒトに投与する際のアレルギー等の副作用を全く惹起しないことから医薬品として極めて有用である。

- 84 -

## 請求の範囲

1. AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる関節症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。
2. 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項 1 に記載の医薬組成物。
3. 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の医薬組成物。
4. 該関節症が、関節リウマチであることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載の医薬組成物。
5. 該関節症が、変形性関節症であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかに記載の医薬組成物。
6. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬組成物：
  - a) AILIM に結合する抗体またはその一部；
  - b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
  - c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
  - d) AILIM に結合するポリペプチド。



- 85 -

8. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

9. 該非蛋白性物質が、DNA、RNA または化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項 8 に記載の医薬組成物。

10. AILIM を介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる炎症を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

11. 該物質が、AILIM 発現細胞の増殖を抑制するか、または AILIM 発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項 10 に記載の医薬組成物。

12. 該サイトカインが、Th1 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、または Th2 タイプの T 細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン 4 であることを特徴とする請求項 11 に記載の医薬組成物。

13. 該炎症が、肝炎であることを特徴とする請求項 10 乃至請求項 12 のいずれかに記載の医薬組成物。

14. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項 10 乃至請求項 13 のいずれかに記載の医薬組成物。

15. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項 14 に記載の医薬組成物：

- a) AILIM に結合する抗体またはその一部；
- b) AILIM の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIM の細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIM に結合するポリペプチド。

- 86 -

16. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項10乃至請求項13のいずれかに記載の医薬組成物。

17. 該非蛋白性物質がDNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項16に記載の医薬組成物。

18. AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、移植片対宿主反応、移植片対宿主反応または組織若しくは臓器の移植に伴う免疫拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

19. 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項18に記載の医薬組成物。

20. 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項19に記載の医薬組成物。

21. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項18乃至請求項20のいずれかに記載の医薬組成物。

22. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項21に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

23. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項18乃至請求項20のいずれかに記載の医薬組成物。

- 87 -

24. 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項23に記載の医薬組成物。

25. AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、外来抗原または自己抗原により惹起される免疫反応を抑制するための医薬組成物。

26. 該免疫反応が、該抗原に対する抗体の産生、細胞増殖、またはサイトカインの産生であることを特徴とする請求項25に記載の医薬組成物。

27. 該物質が、AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質であることを特徴とする請求項25または請求項26に記載の医薬組成物。

28. 該サイトカインが、Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ であるか、またはTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4であることを特徴とする請求項27に記載の医薬組成物。

29. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の医薬組成物。

30. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項29に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

31. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項25乃至請求項28のいずれかに記載の医薬組成物。

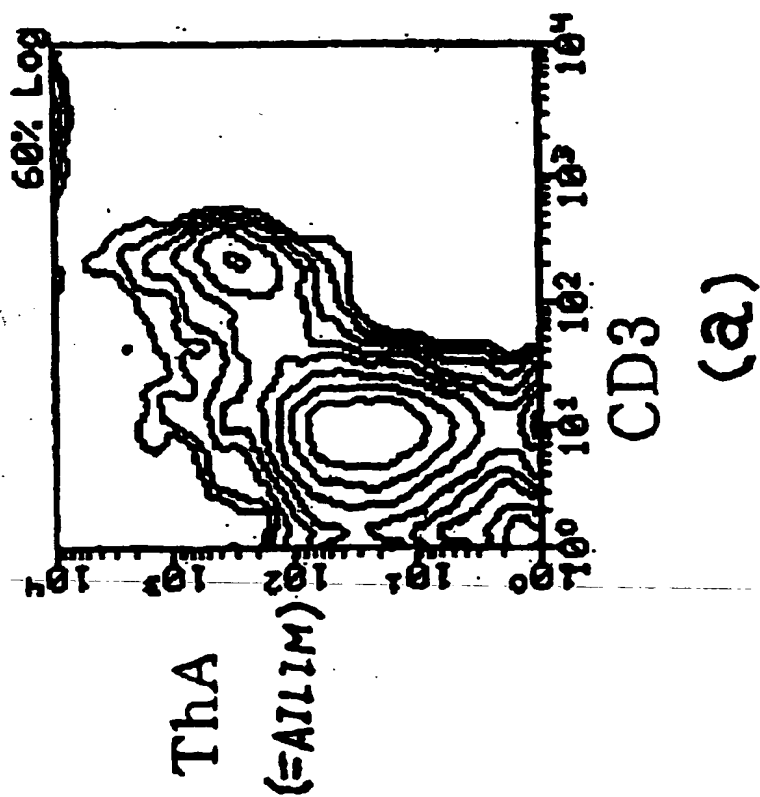
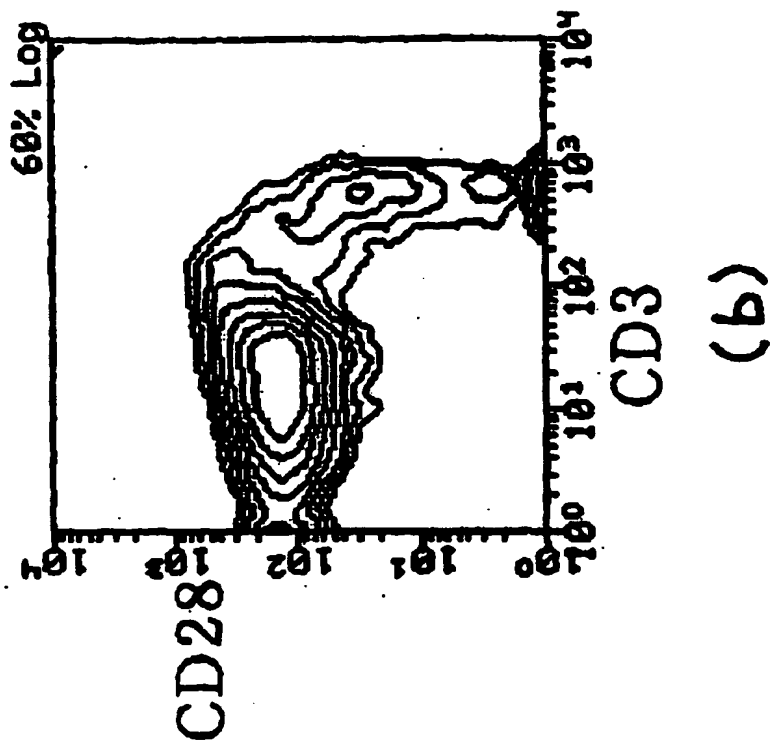
- 8 8 -

32. 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項31に記載の医薬組成物。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 5 2

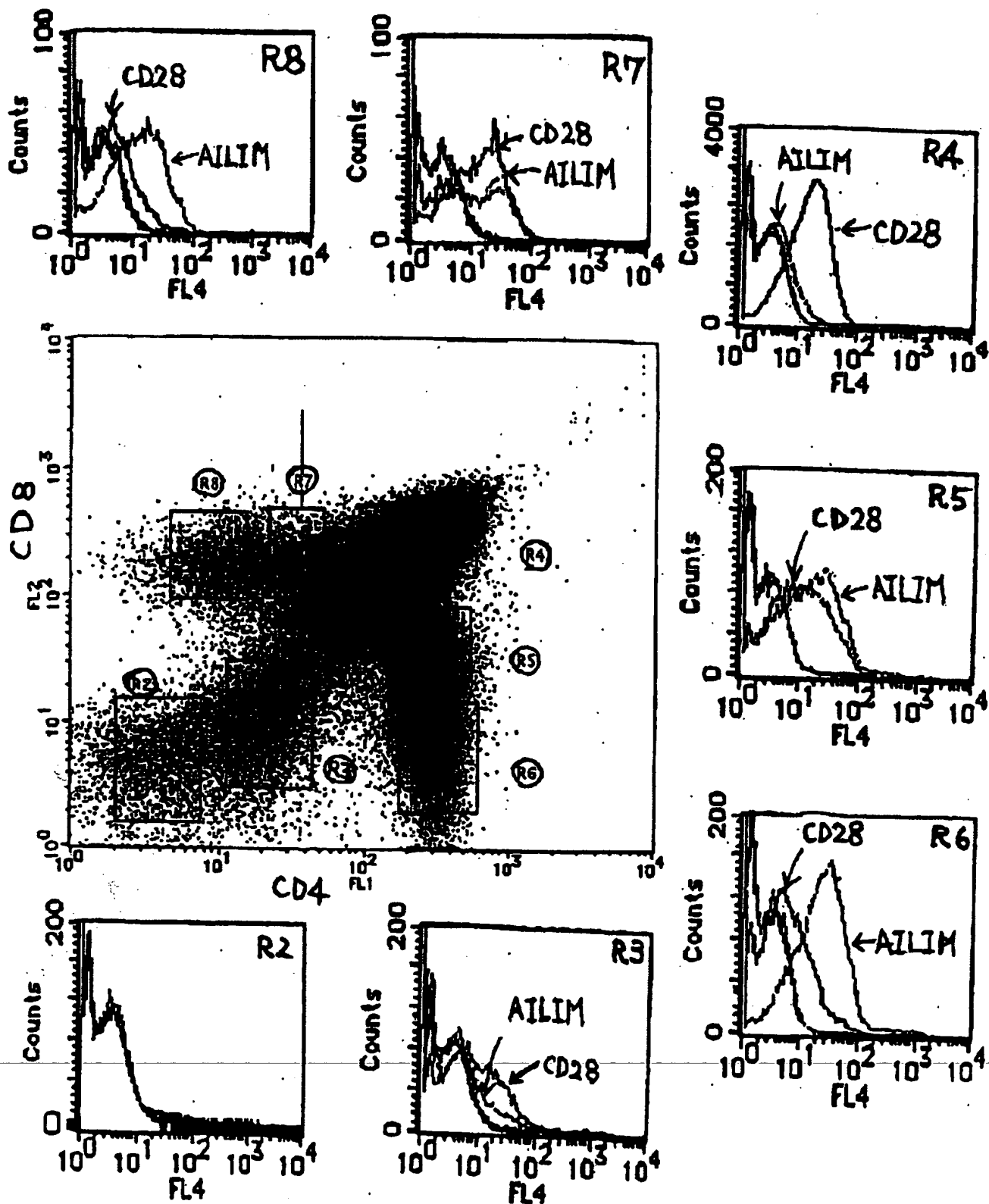
☒ 1



THIS PAGE BLANK (98712)

2 / 5 2

2

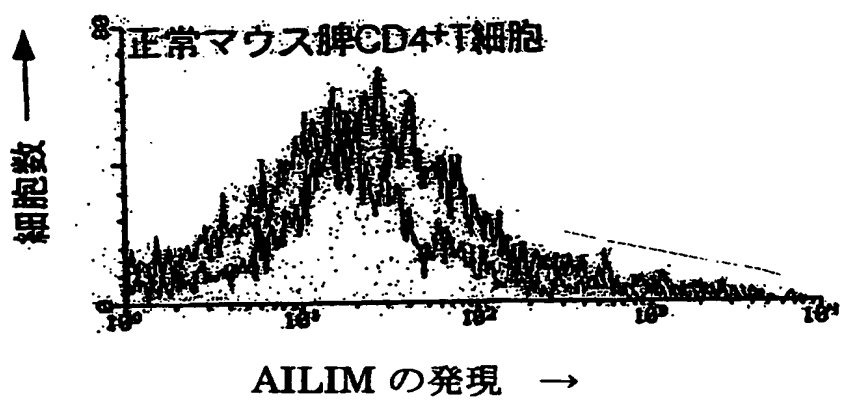


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



3 / 52

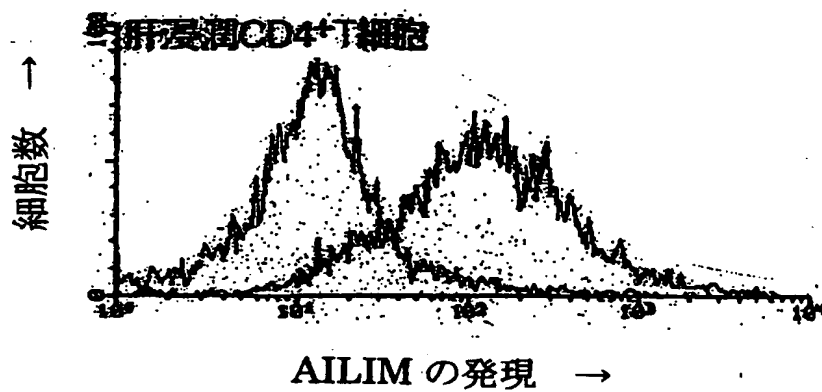
図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

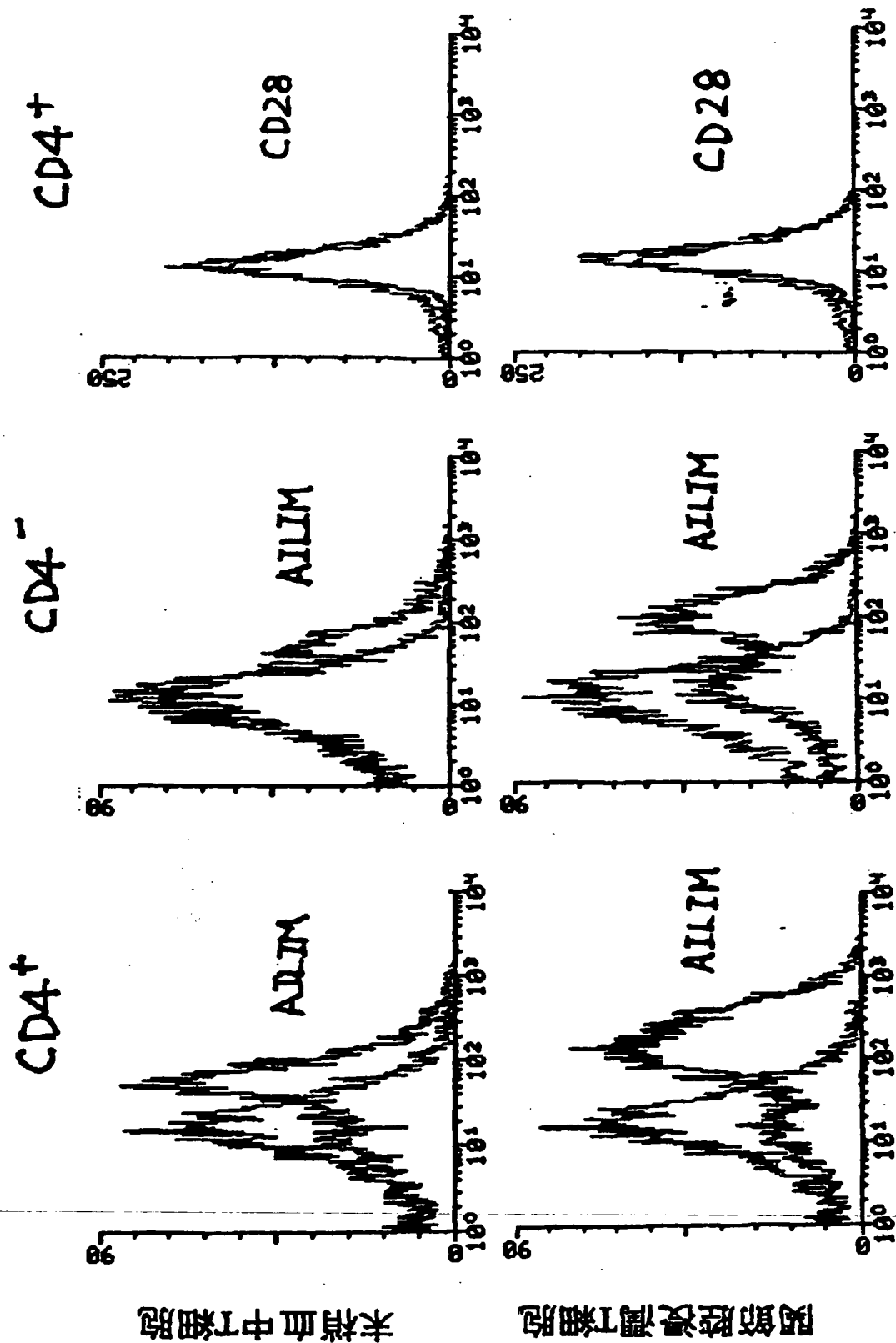
4 / 5 2

図 4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

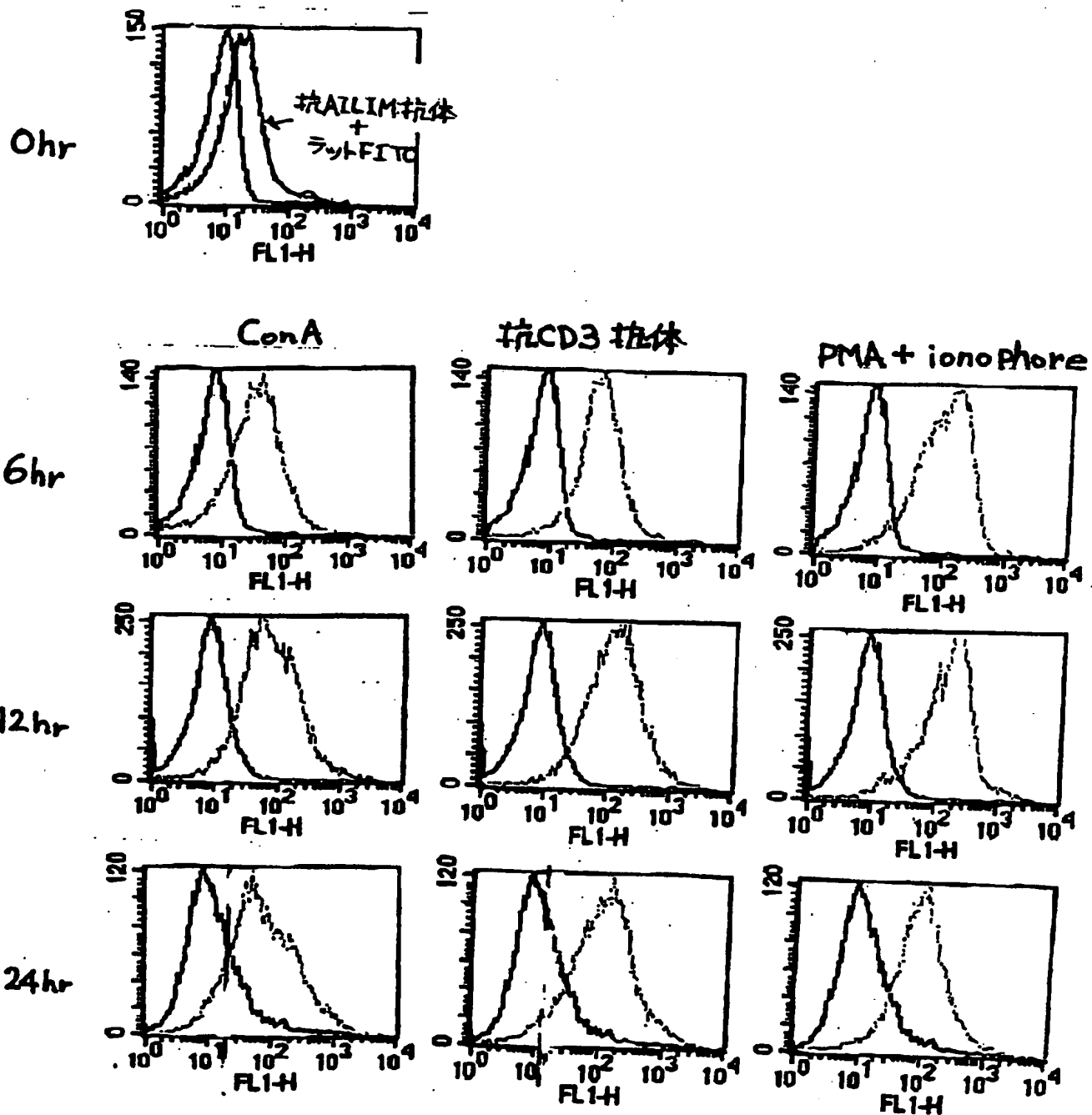
図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 5 2

図 6



**THIS PAGE BLANK (USP)**



7 / 5 2

図 7

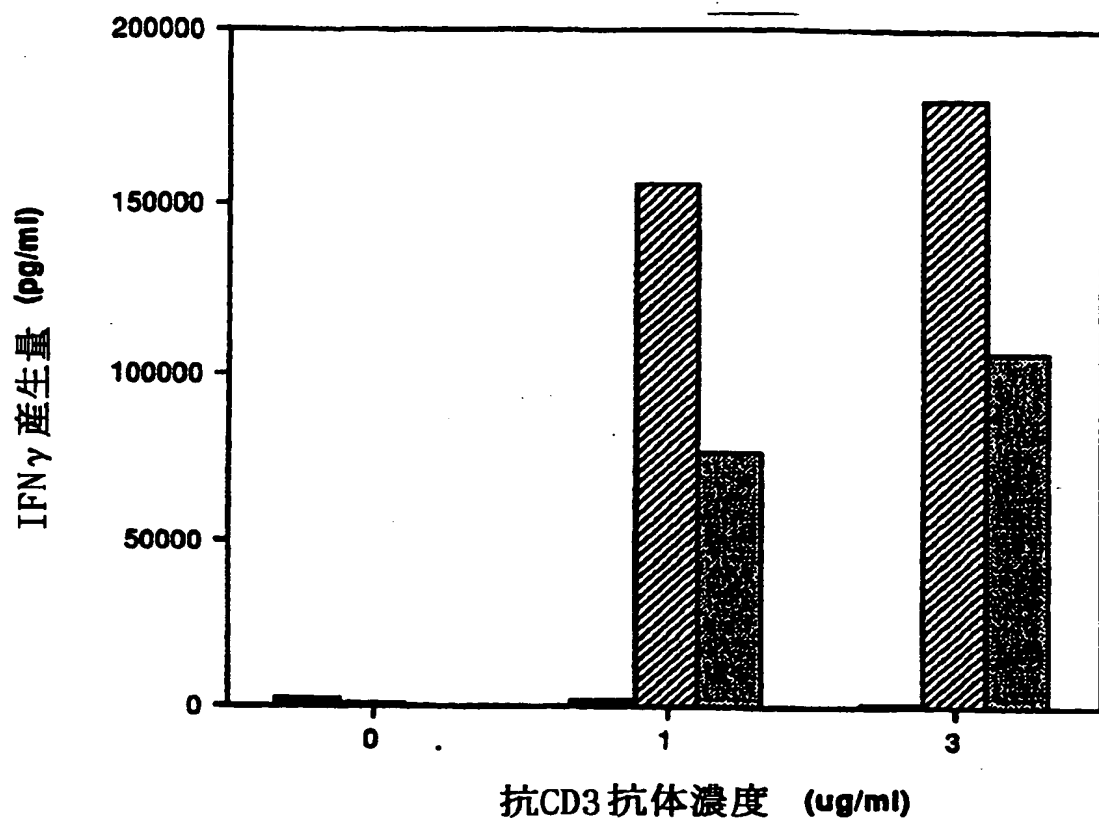
## 各種 T 細胞株の AILIM (マウス) の発現パターン

line	specificity	Lymphokine	Th1/Th2	CD28/AILIM
<b>1. T 細胞株</b>				
D10	Con-Albumin	IL-4	Th2	+/+
<u>MS202</u>	I-A <sup>b</sup>	IL-4	Th2	+/+
<u>CD28KO</u>	I-E <sup>b</sup>	IL-4	Th2	-/-
<u>EL-4</u>	?	IL-4/-2	Th0	+/+
2L2	Cytochrome C	IL-2/IFN- $\gamma$	Th1	+/-
BC3C13	Mls <sup>c</sup>	IFN- $\gamma$	Th1	+/-
<b>2. T ハイブリドーマ (BW5147 親株)</b>				
KV24	?	IL-2	Th1	+/-
DO.11.10	OVA	IL-2	Th1	+/-
8-4-31	SEB	IL-2	Th1	+/-
3H10-11	SEB	IL-2	Th1	+/-
61-21-25	SEB	IL-2	Th1	+/-
1-2-66	SEB	IL-2	Th1	+/-
6-13-64	SEB	IL-2	Th1	-/-

**THIS PAGE BLANK (USP#)**

8 / 5 2

図 8



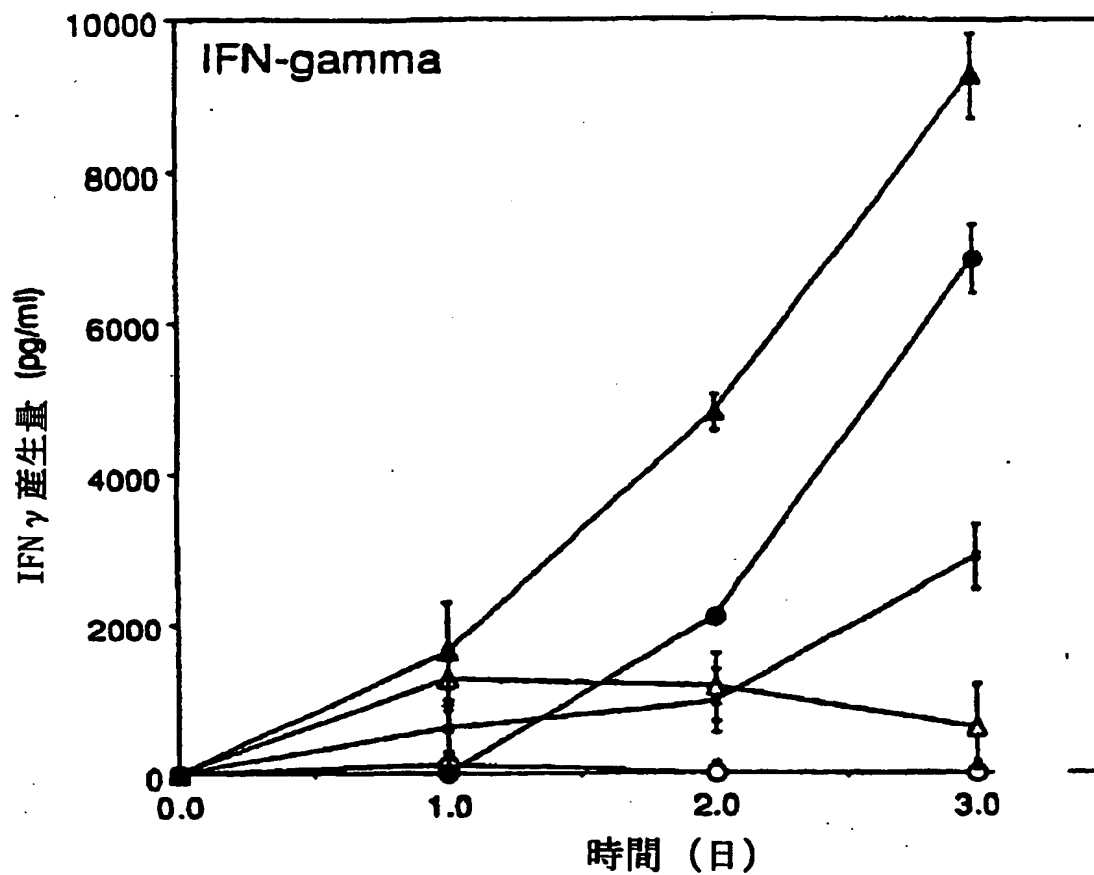
- 抗 CD3 抗体のみコーティング
- ▨ 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体をコーティング (day 3)
- ▤ 抗 CD3 抗体 + 抗マウス AILIM 抗体 (B10.5) をコーティング (day 3)

)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9 / 5 2

図 9

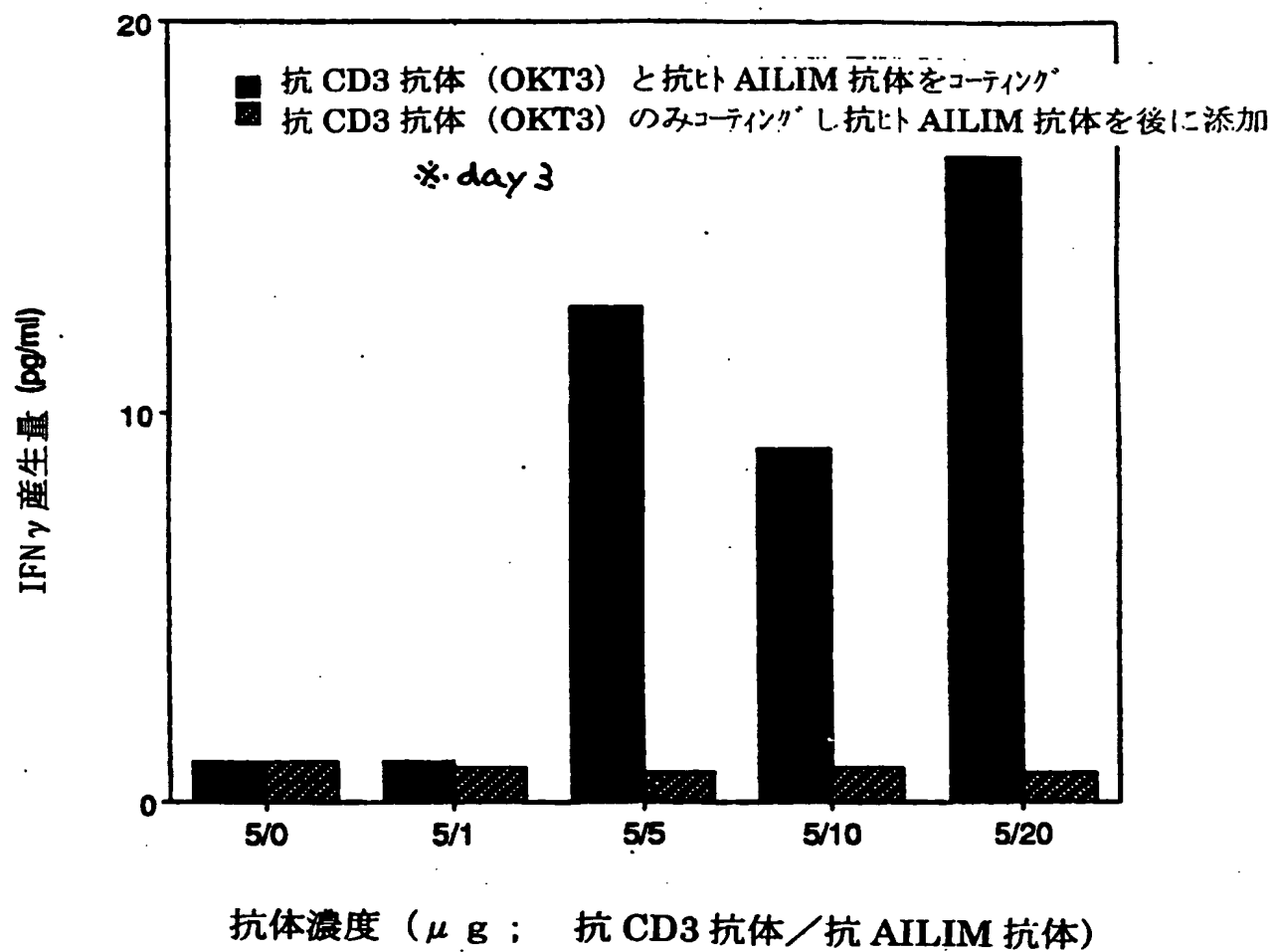


- ▲ 抗 CD3 抗体 + 抗ラット AILIM 抗体 (JTT-1 抗体) をコーティング
- 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体をコーティング
- × 抗 CD3 抗体のみコーティング
- △ 抗ラット AILIM 抗体 (JTT-1 抗体) のみコーティング
- 抗 CD28 抗体のみコーティング

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/52

図 10

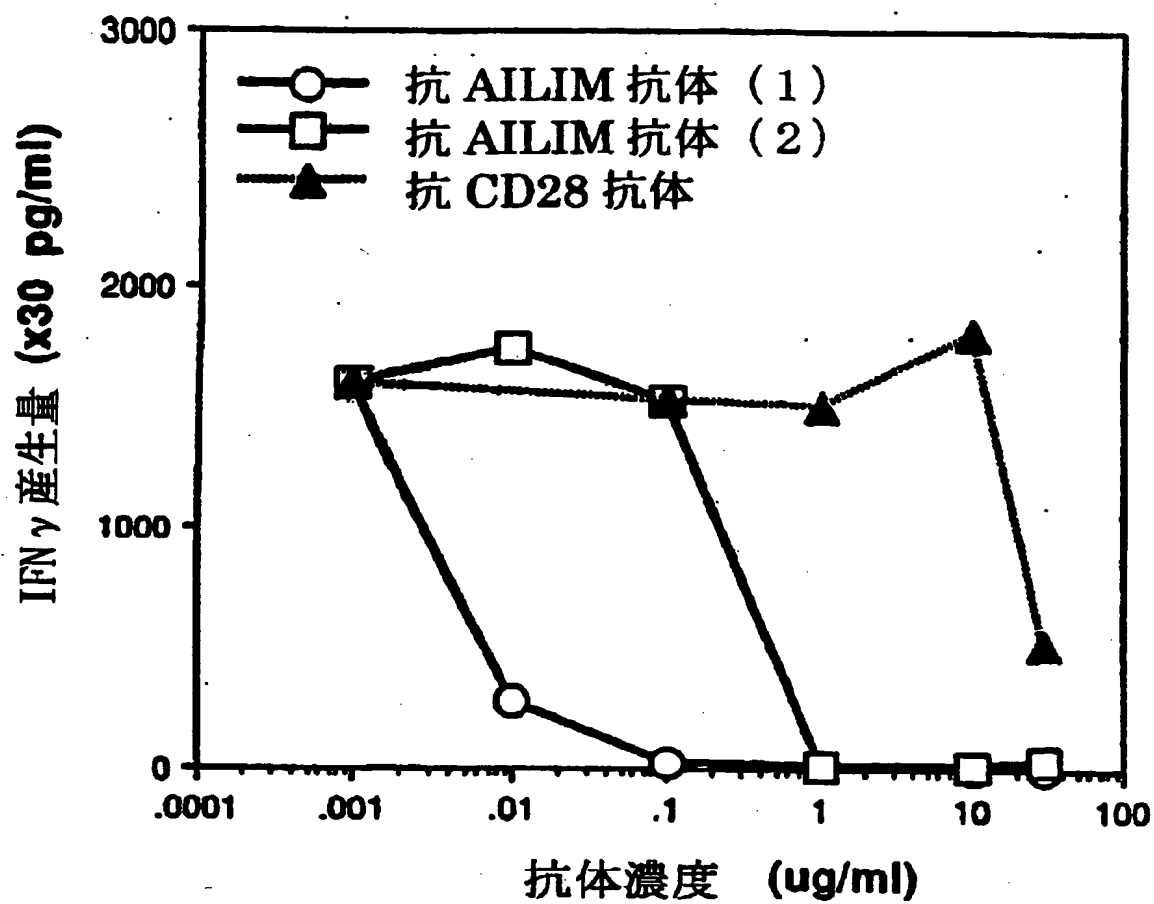


THIS PAGE BLANK (USPTO)



11/52

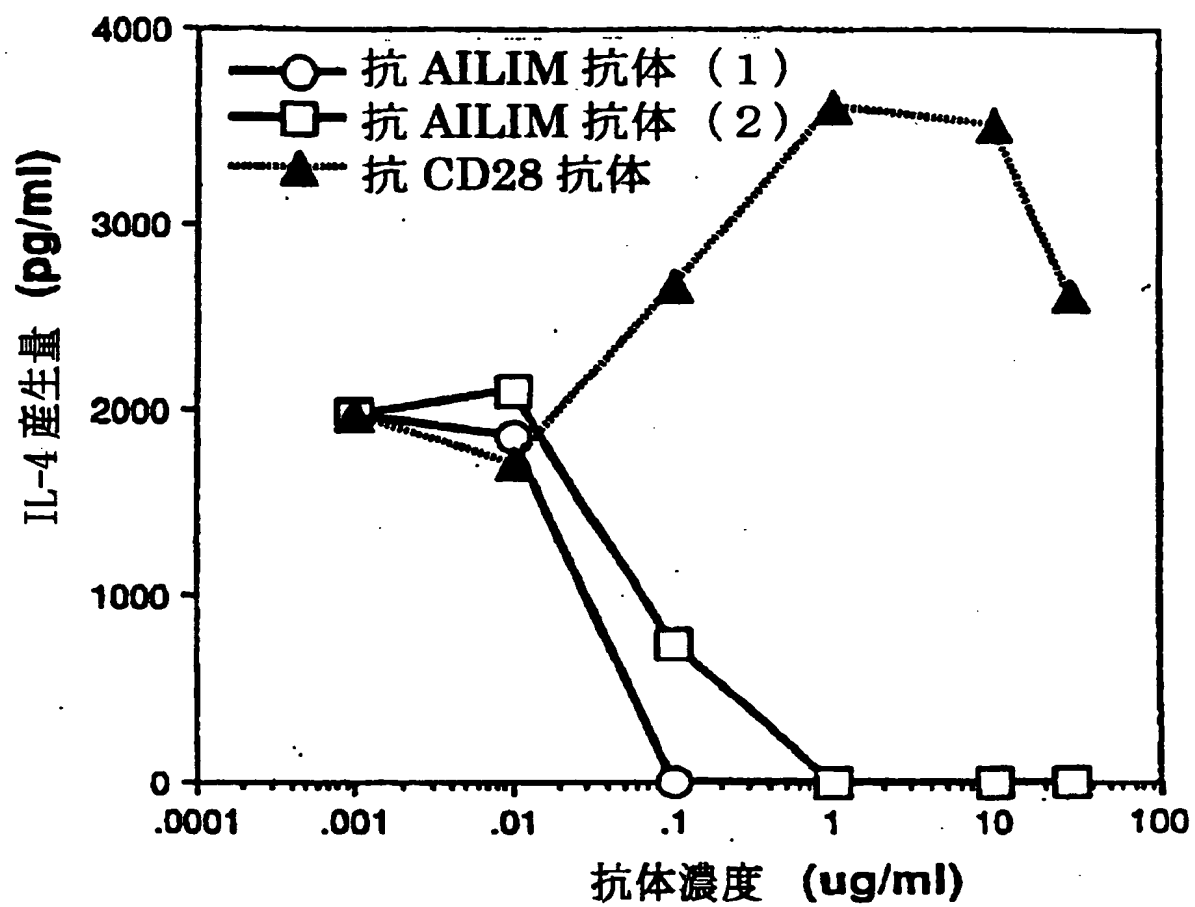
図 1 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

12/52

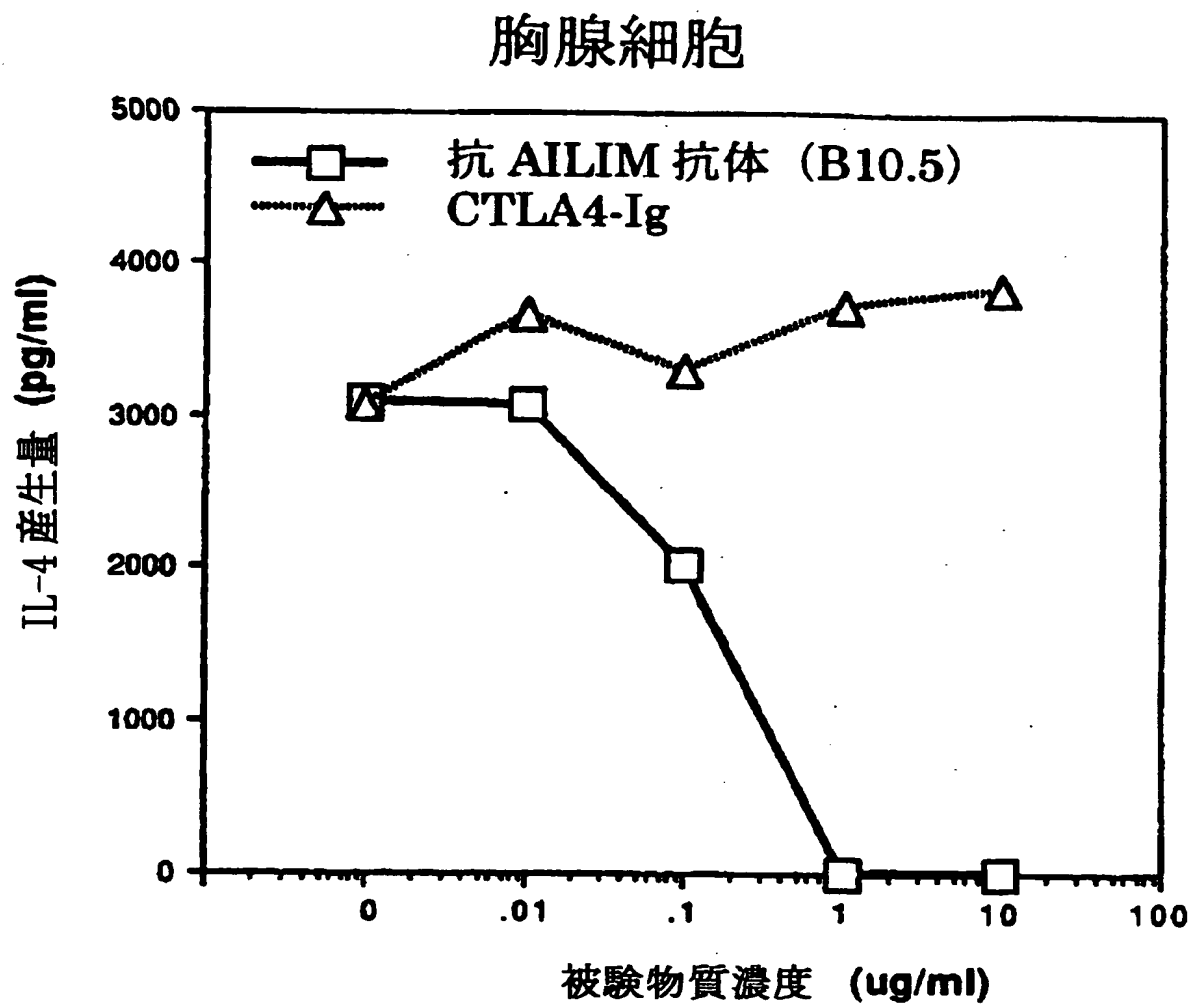
図 12



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13/52

図 13

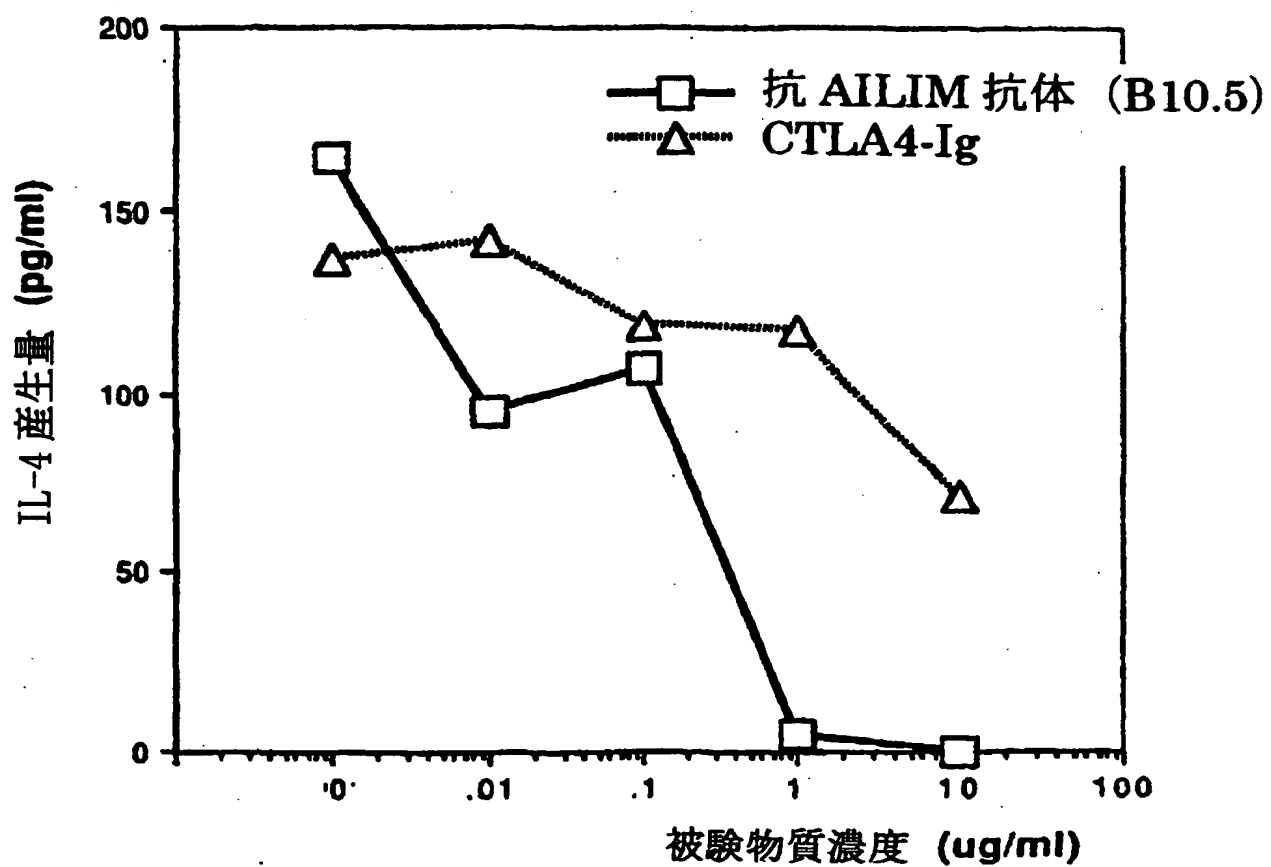


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14/52

図 14

## 脾臓細胞

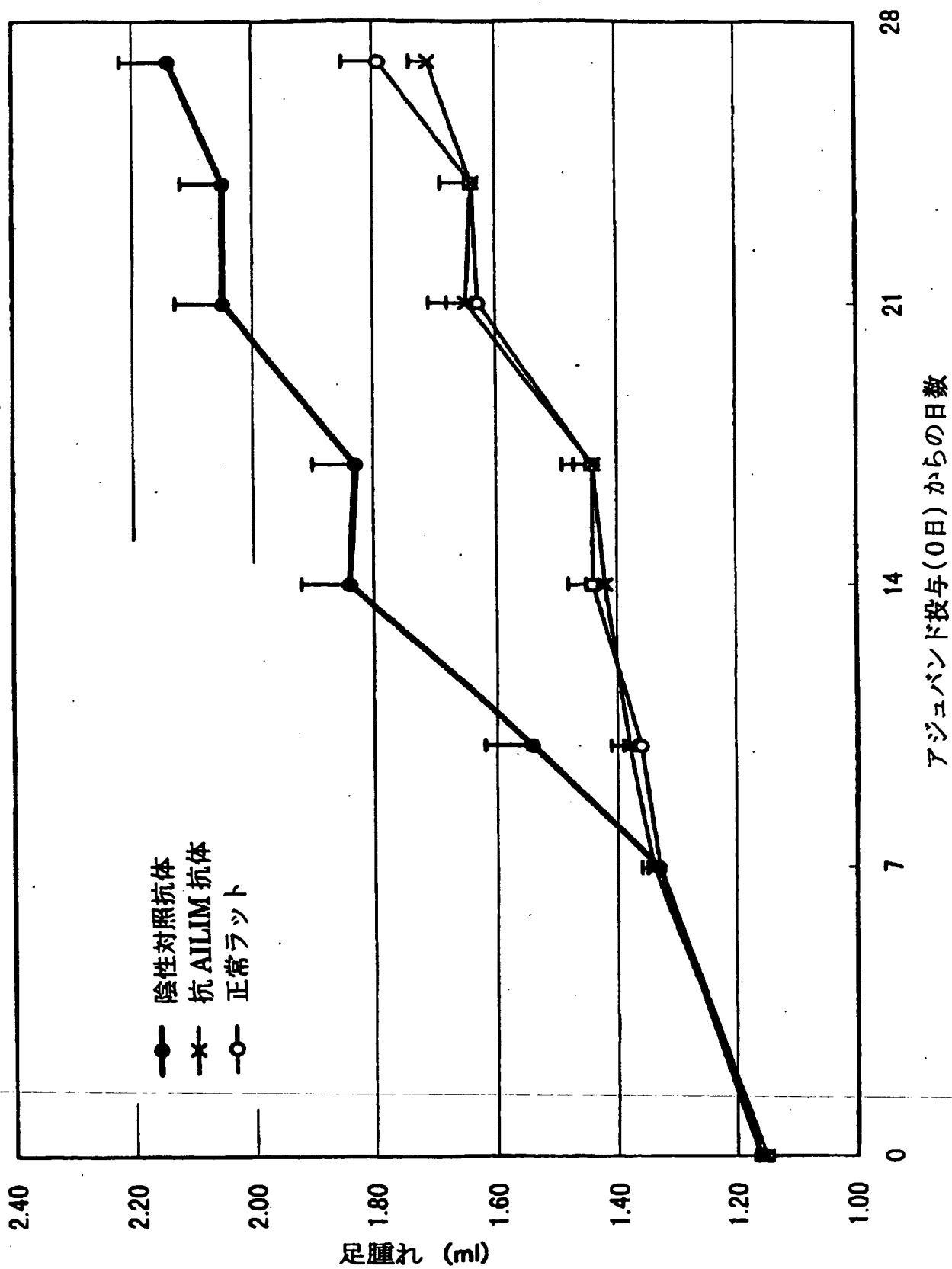


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



15/52

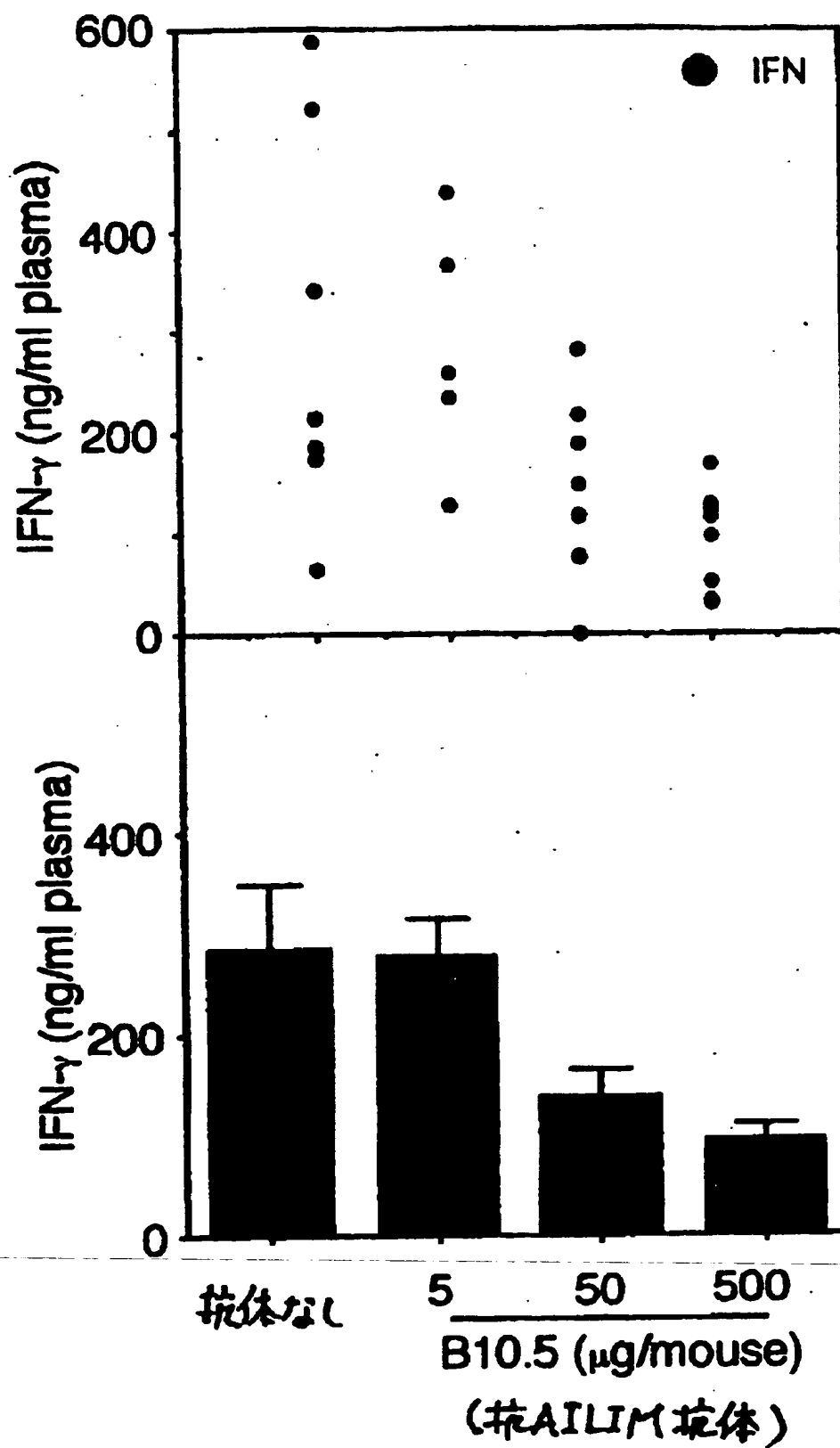
図 15



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

16/52

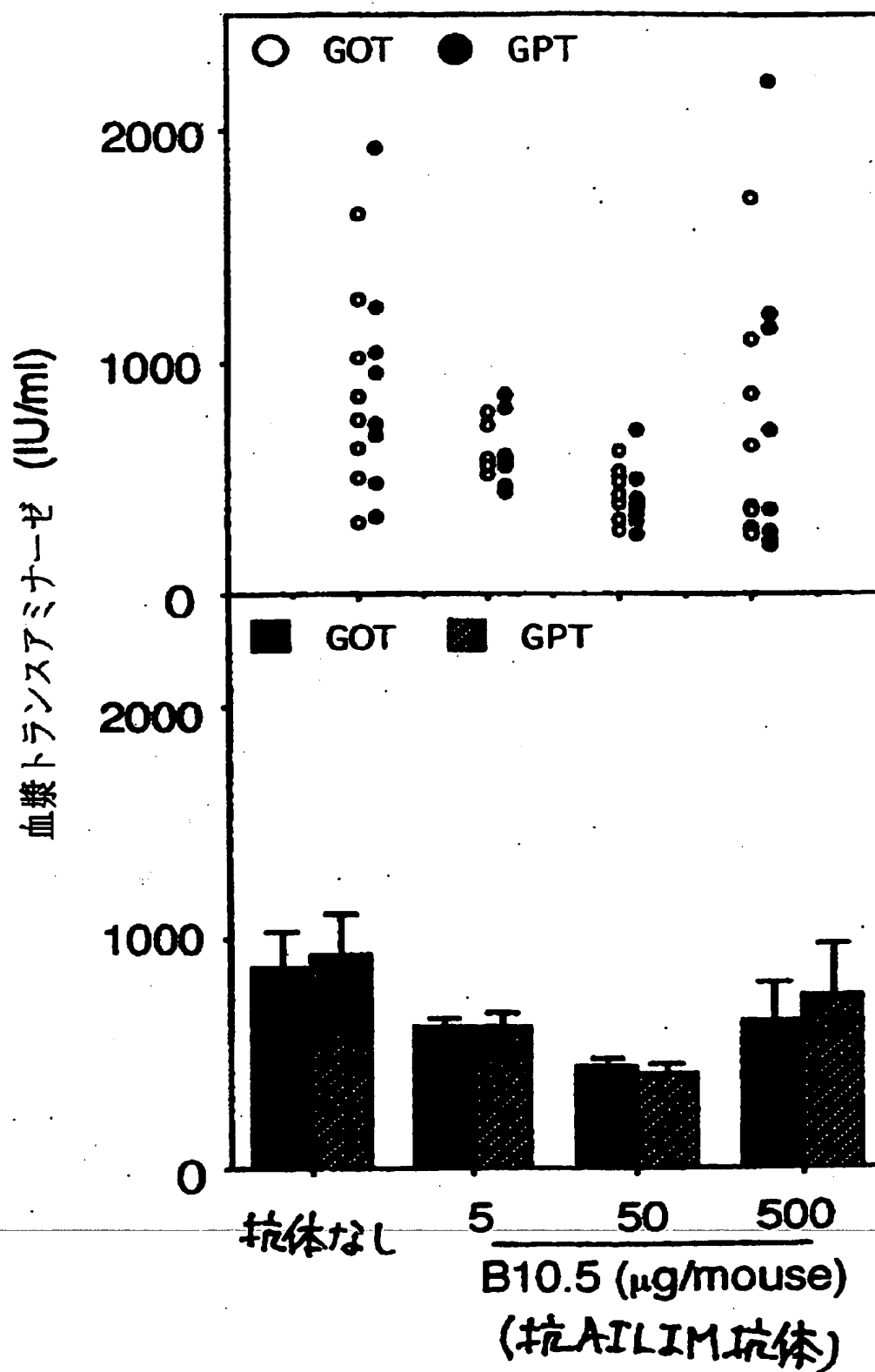
図 16



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

17/52

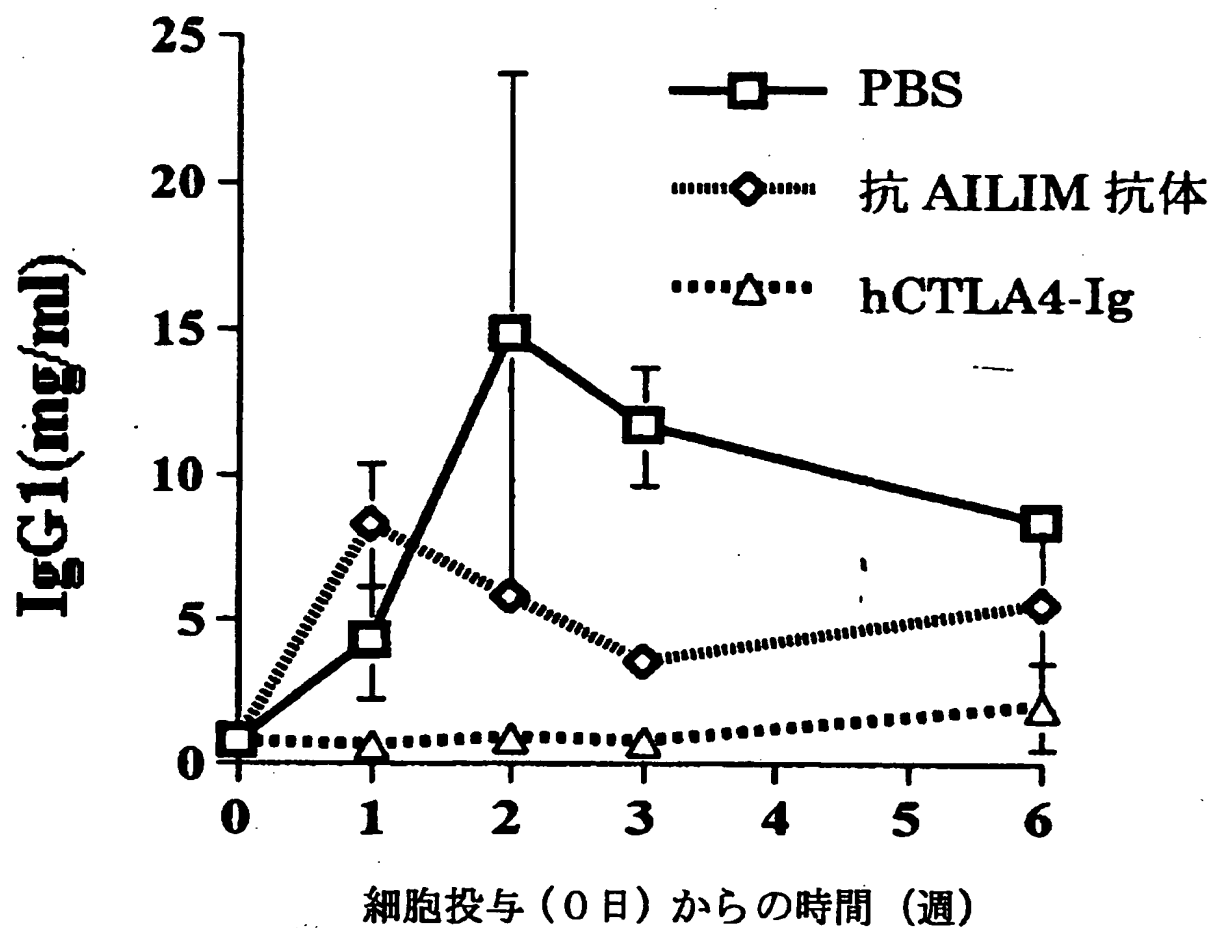
図 17



THIS PAGE BLANK

18/52

図 18

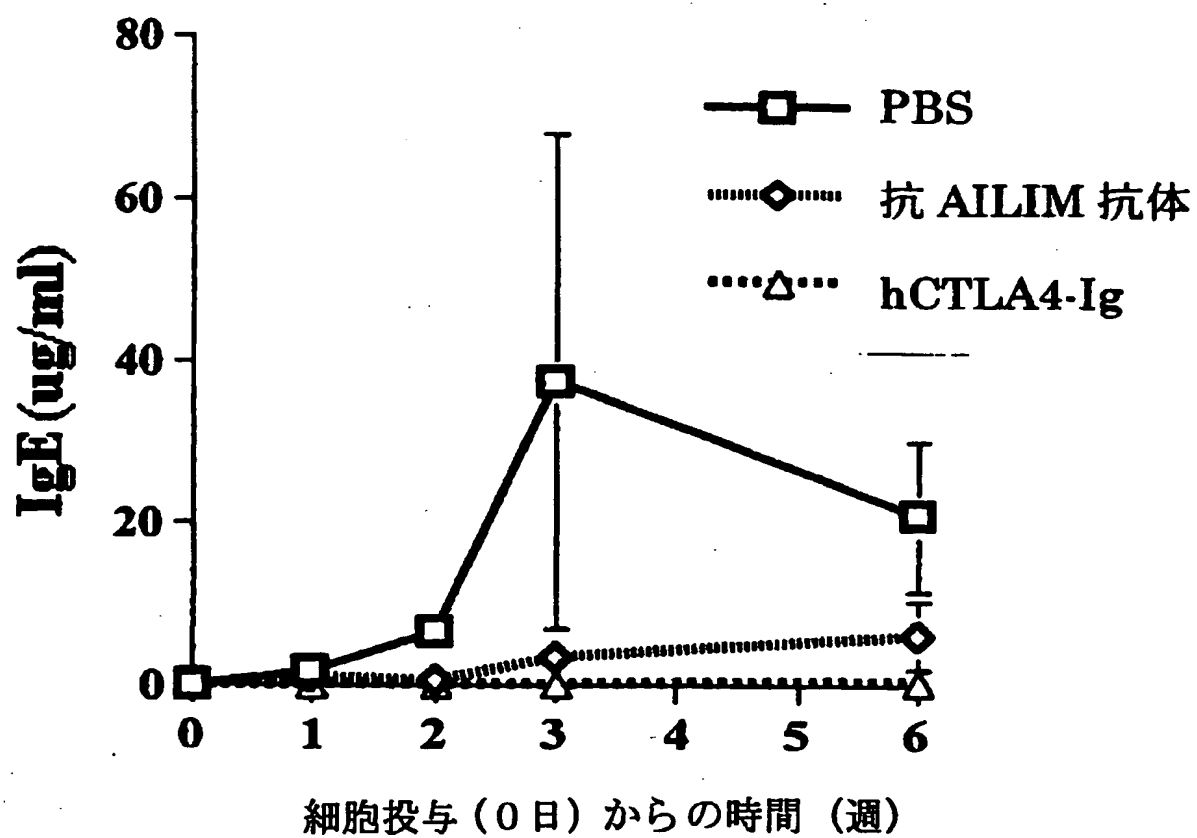


THIS PAGE BLANK (USPTO)



19/52

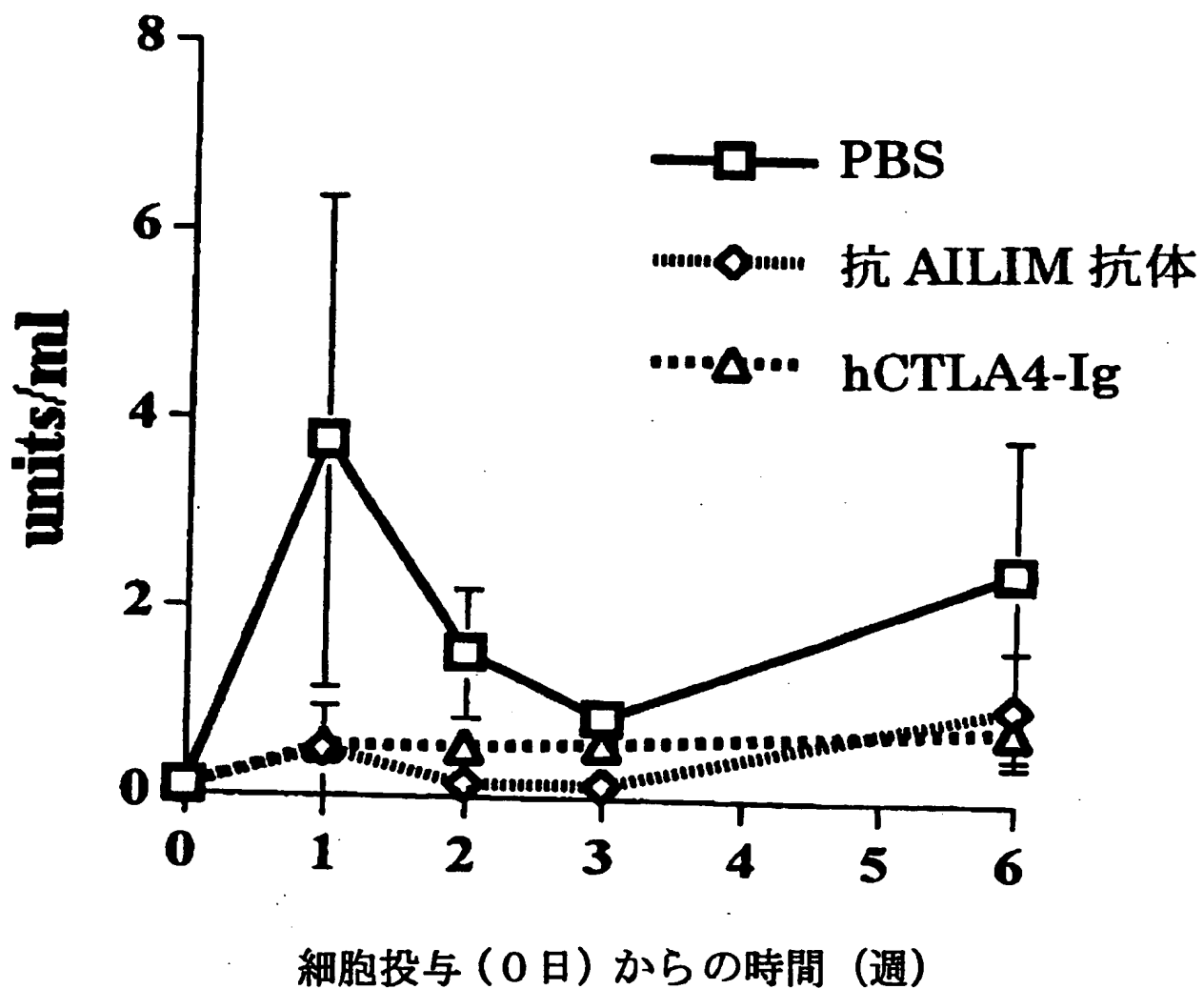
図 19



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

20/52

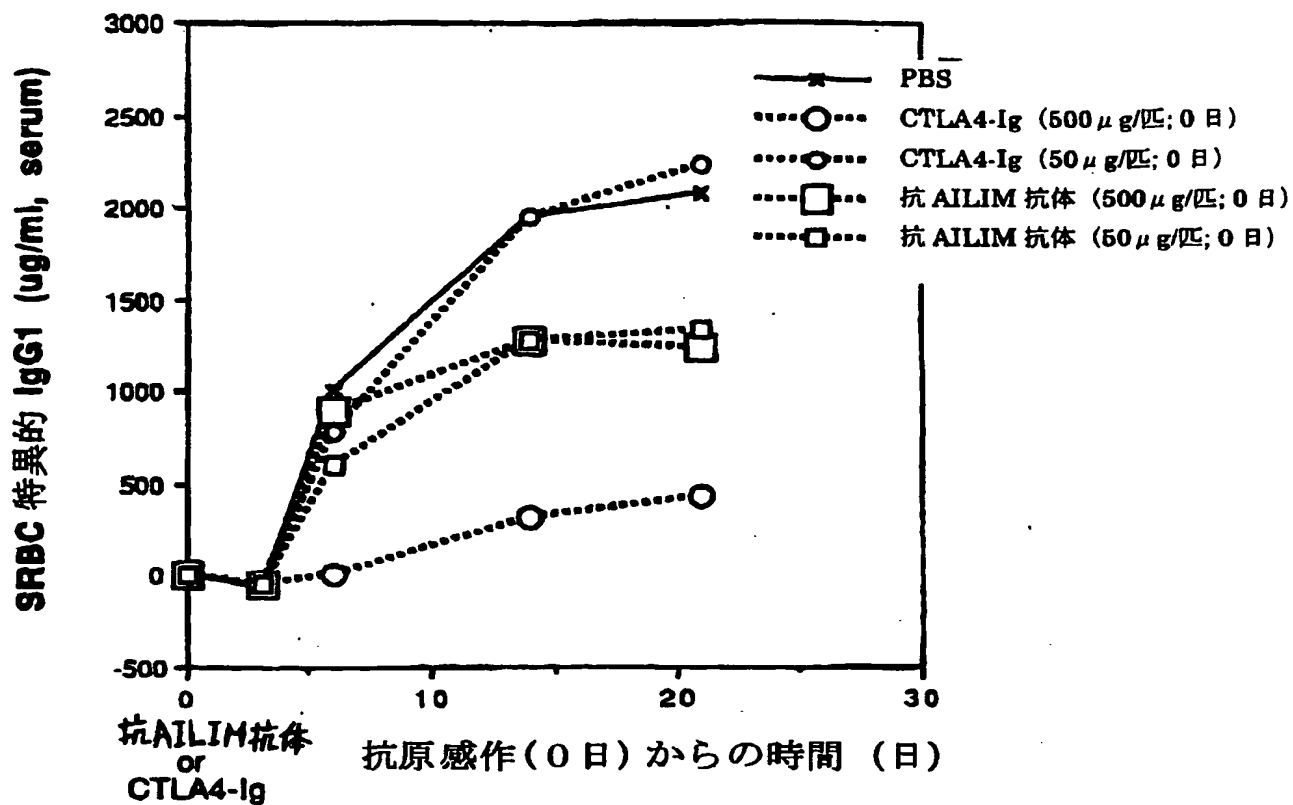
図 20



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

21/52

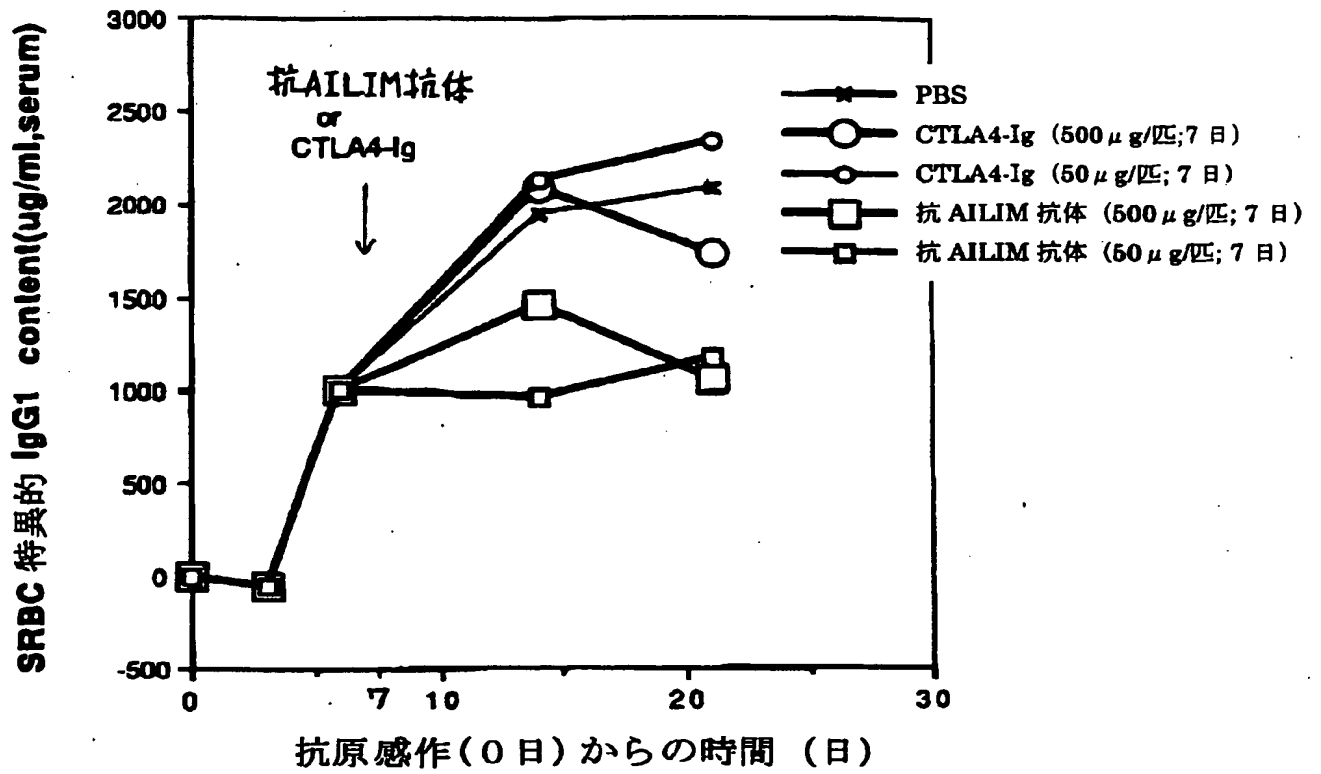
図 21



**THIS PAGE BLANK**

22/52

図 2 2

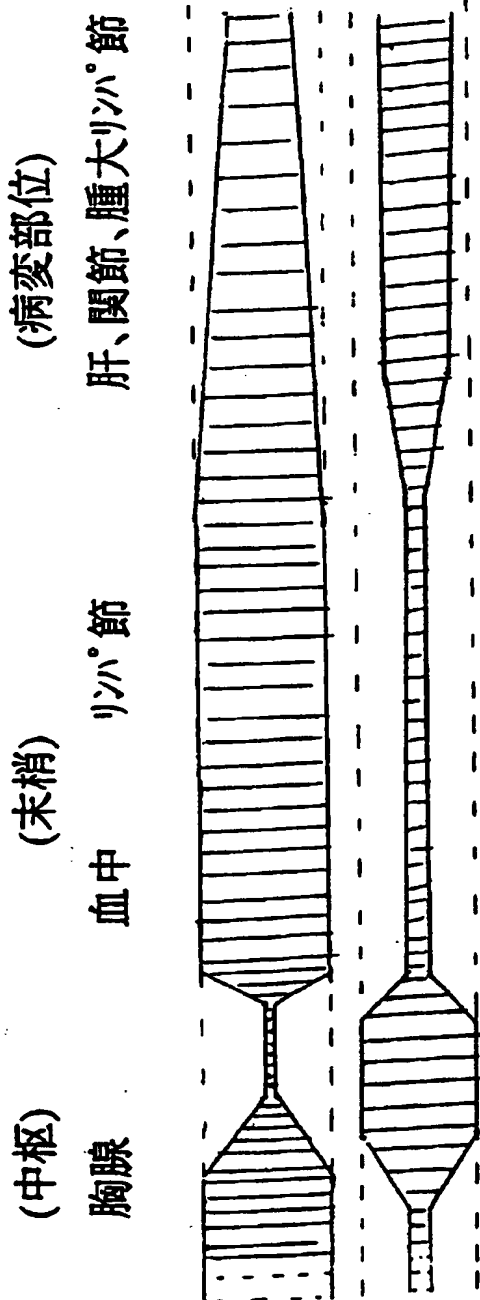


**THIS PAGE BLANK (USP 16)**



23/52

図 23



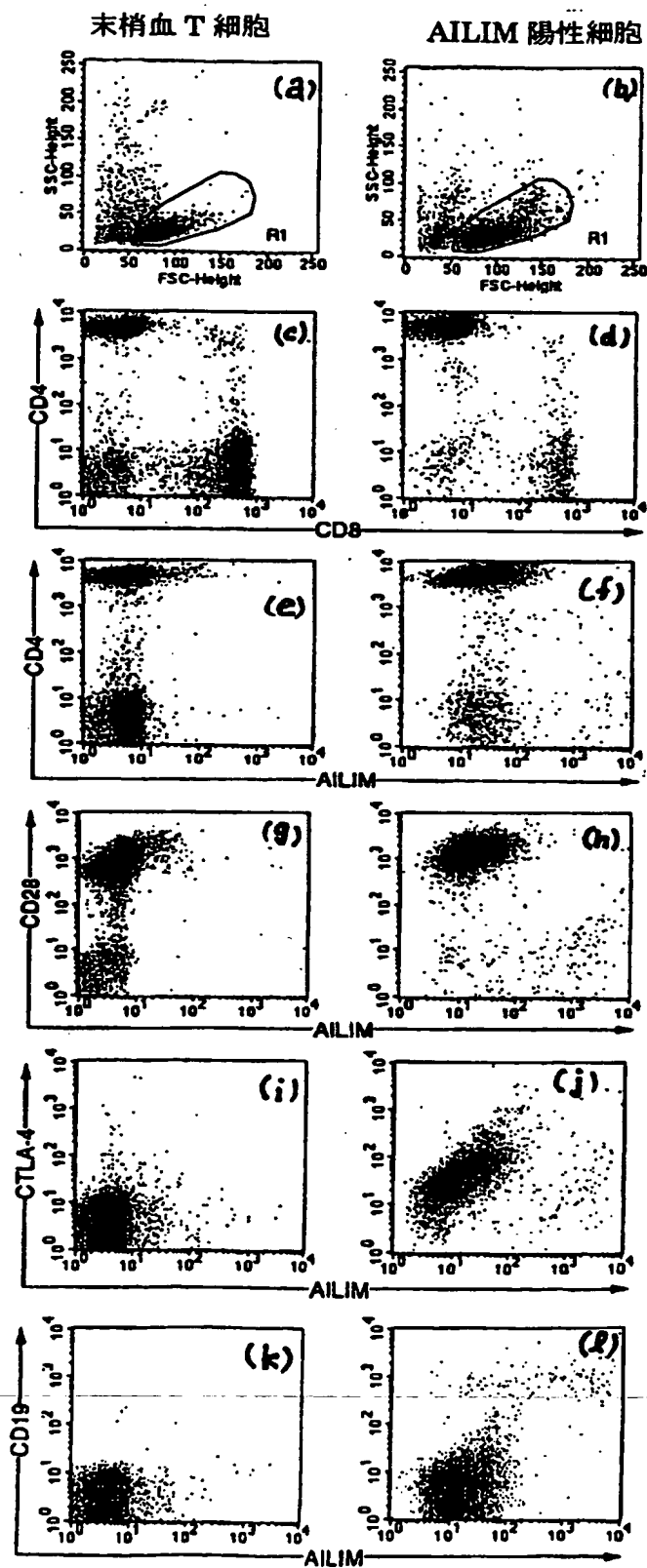
CD28

AILIM  
(ICOS)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

24/52

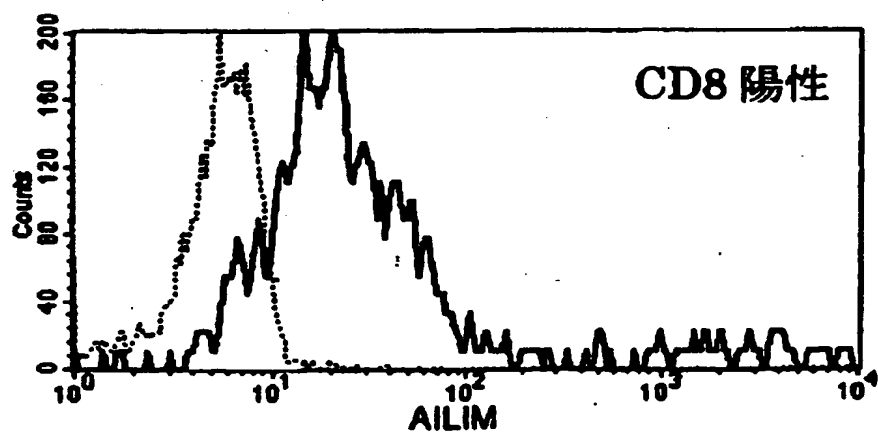
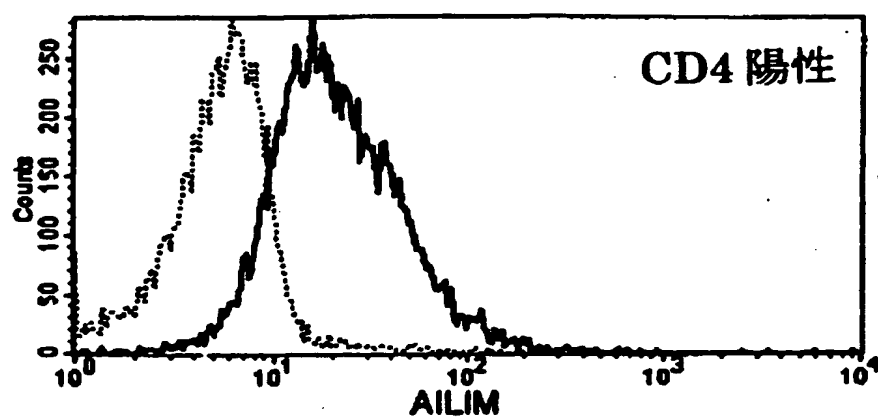
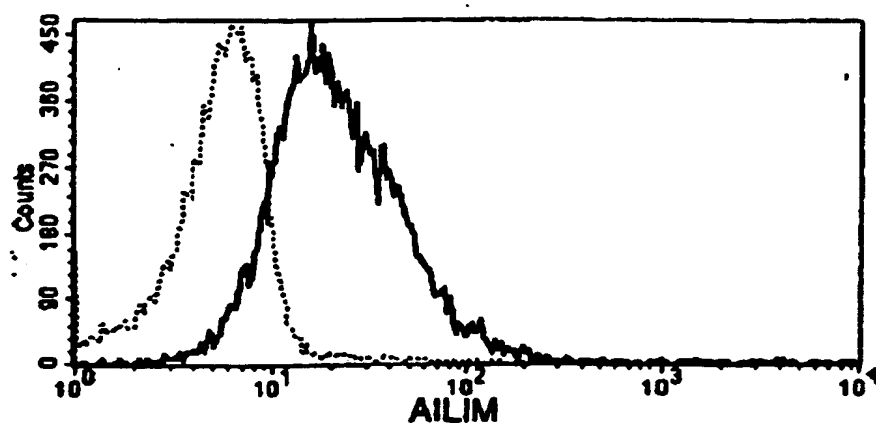
図 24



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

25 / 52

図 25

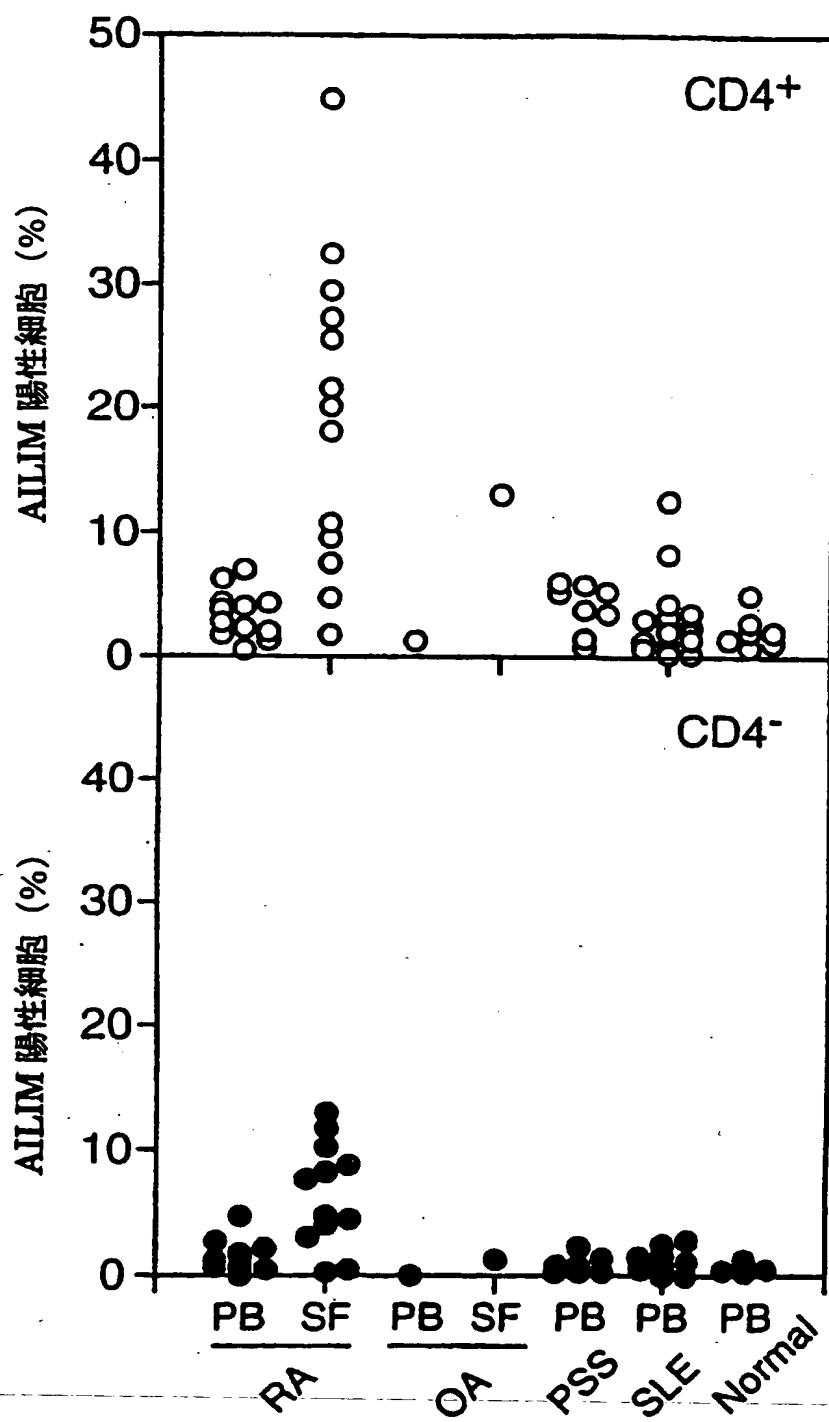


— AILIM 陽性細胞  
..... 末梢血 T 細胞

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

26 / 52

図 26



PB : 末梢血 T 細胞

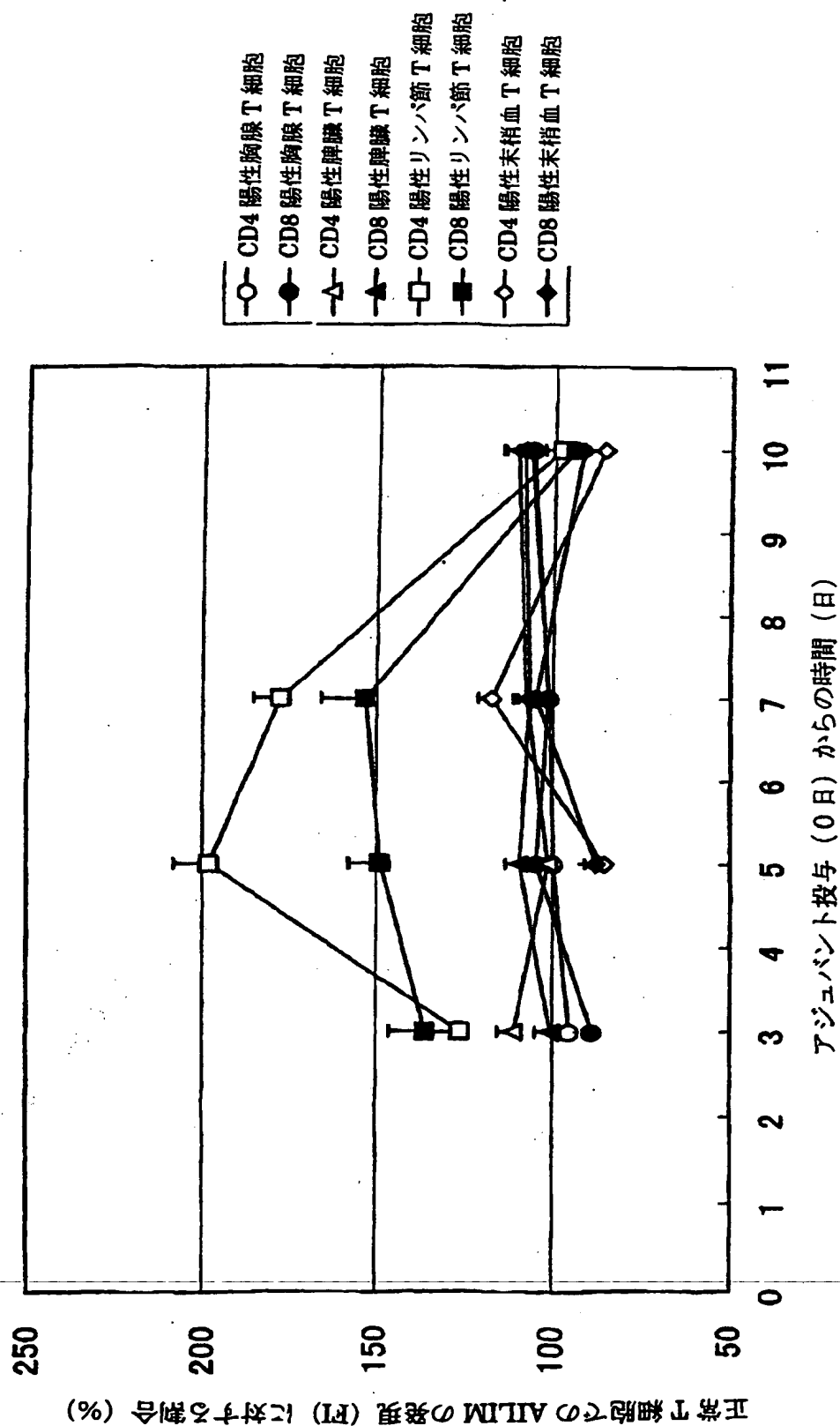
SF : 関節腔液由来 T 細胞

**THIS PAGE BLANK (USE)**



27/52

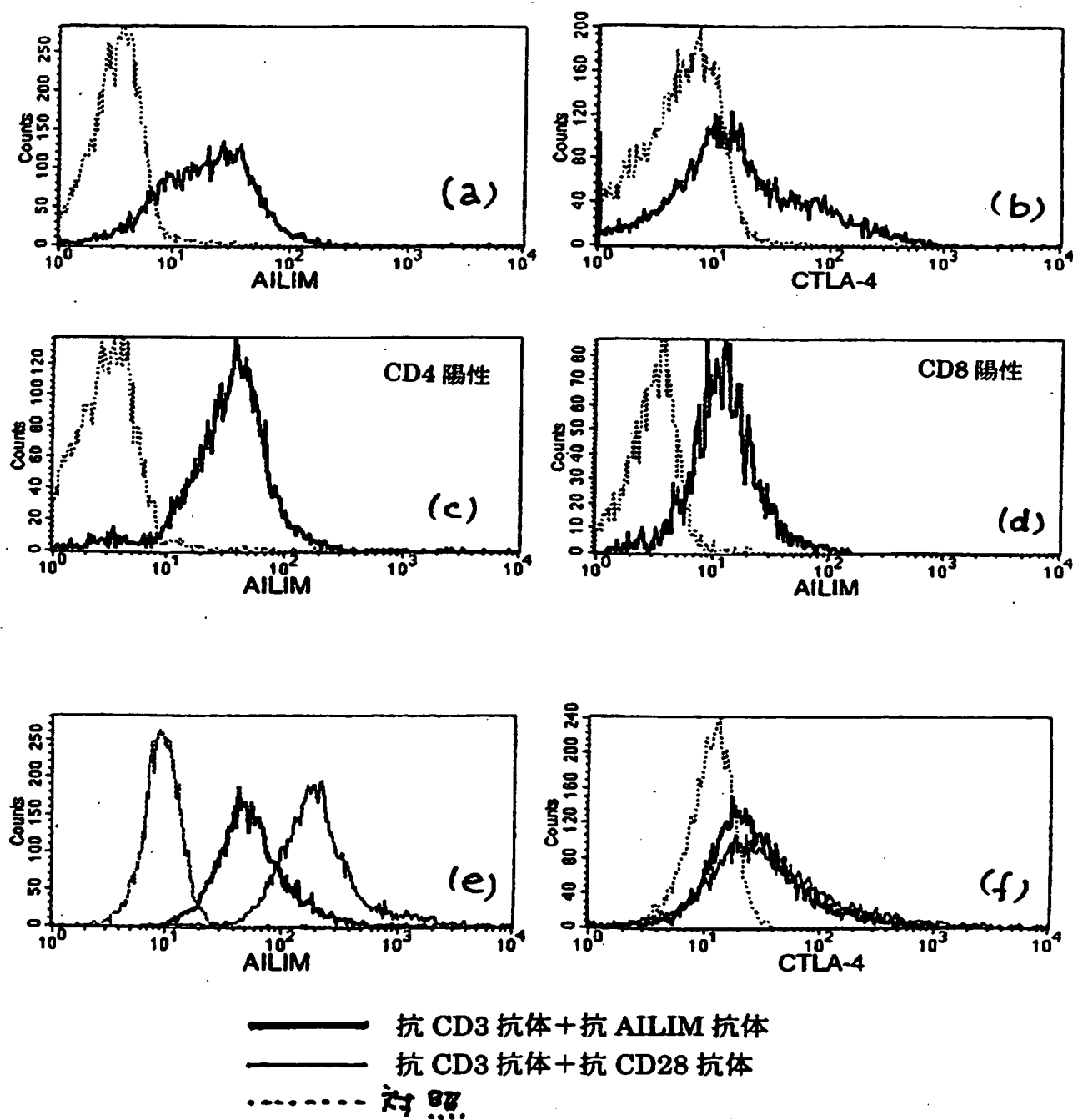
図 27



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

28/52

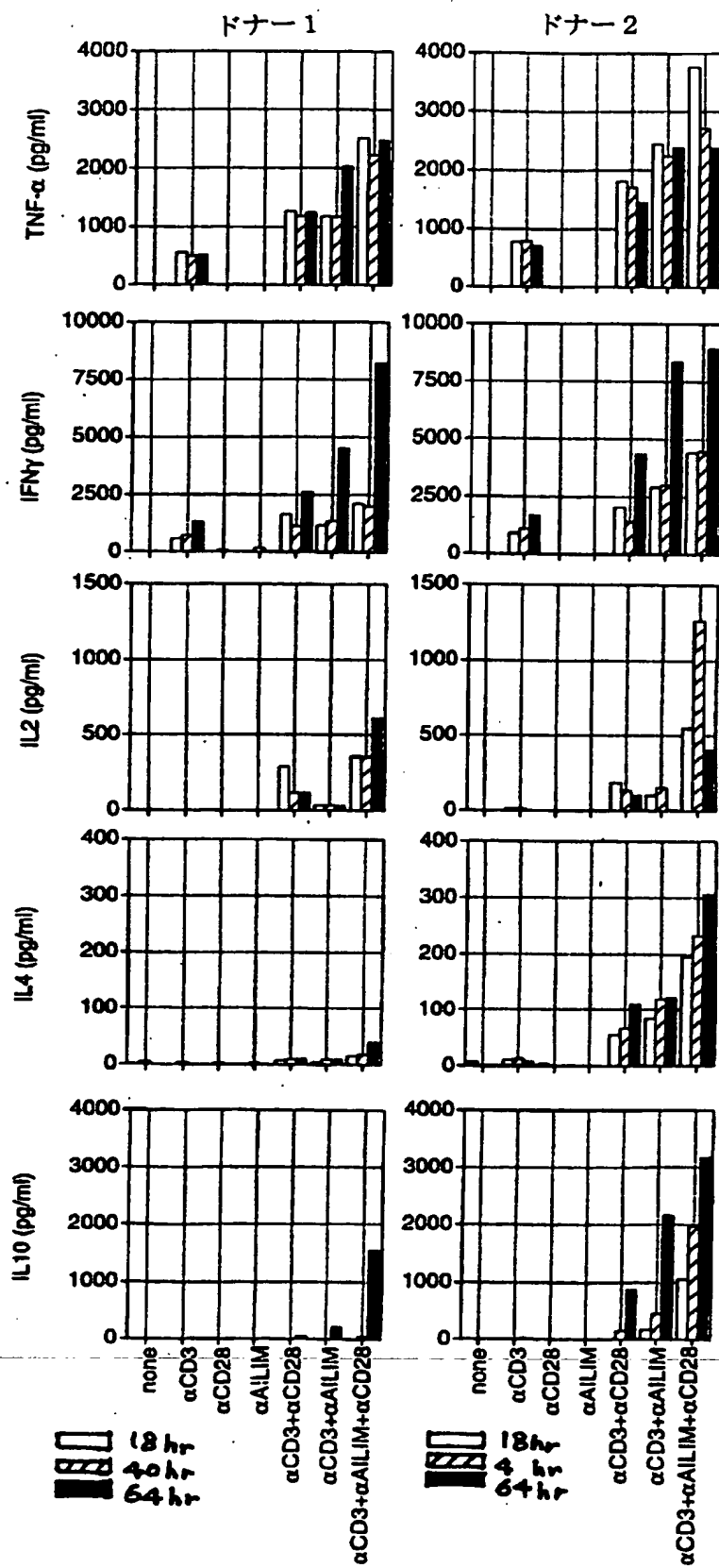
図 28



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

29/52

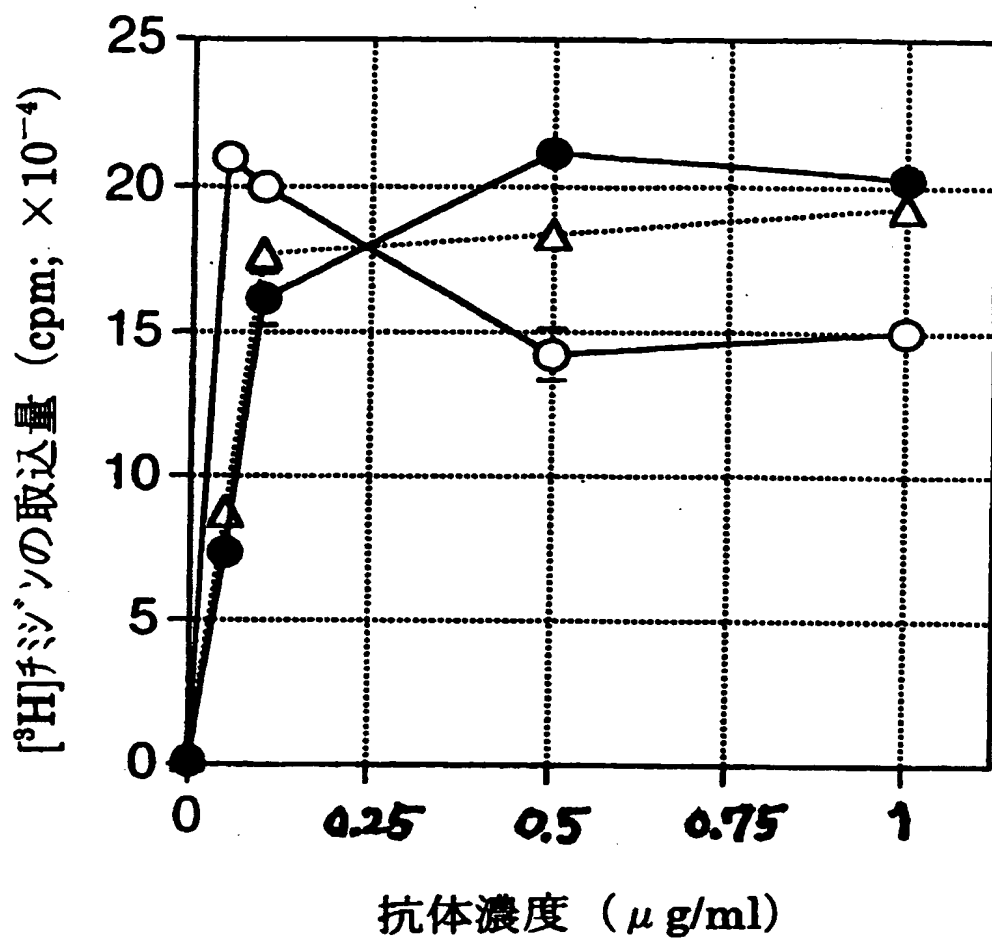
図 29



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

30/52

図 30



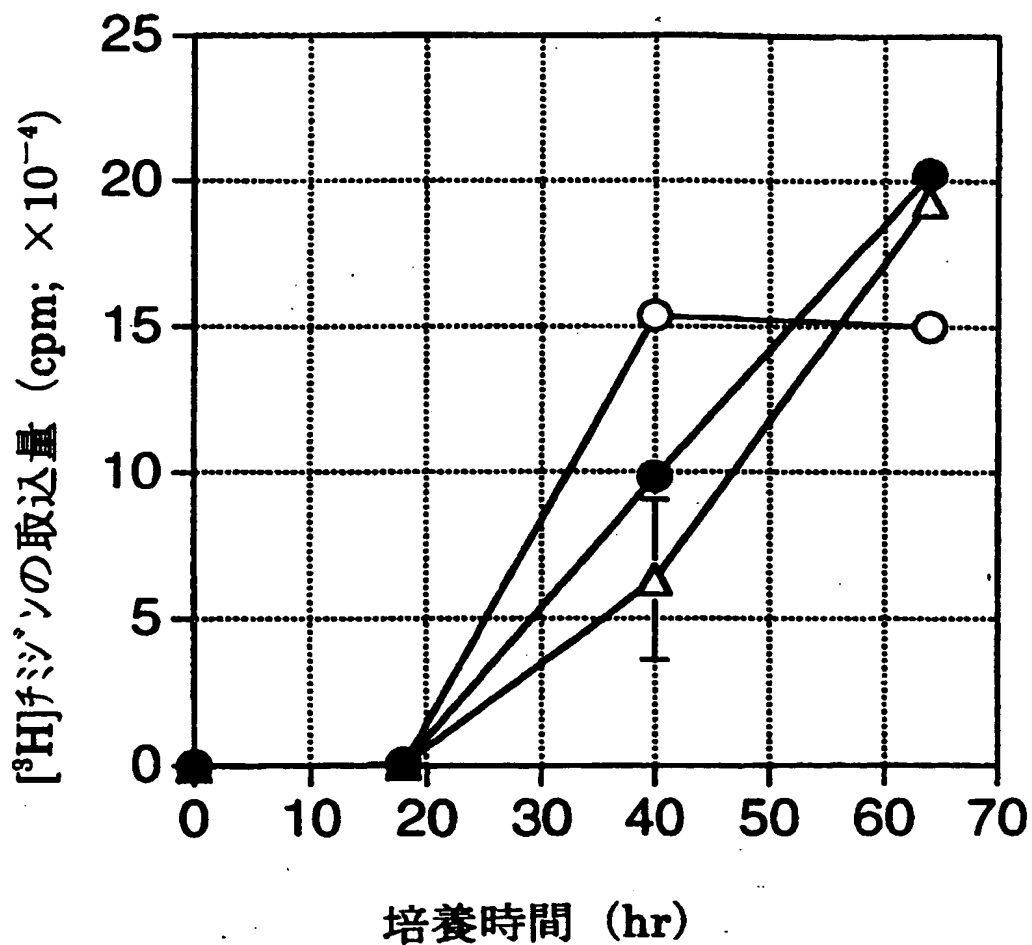
- 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体
- 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体
- △ 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体 + 抗 CD28 抗体

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



31/52

図 3 1

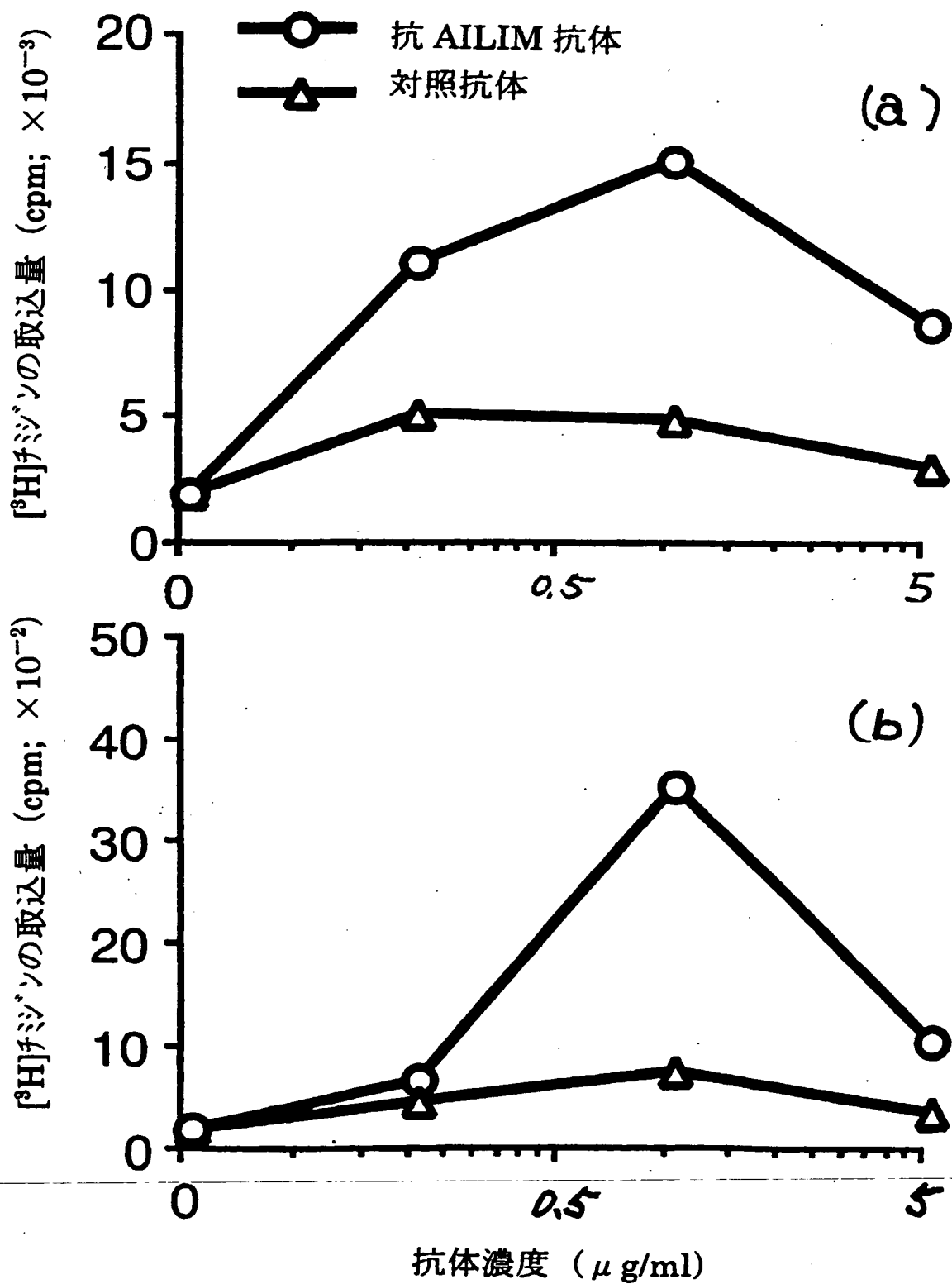


- 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体  
● 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体  
△ 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体 + 抗 CD28 抗体

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

32/52

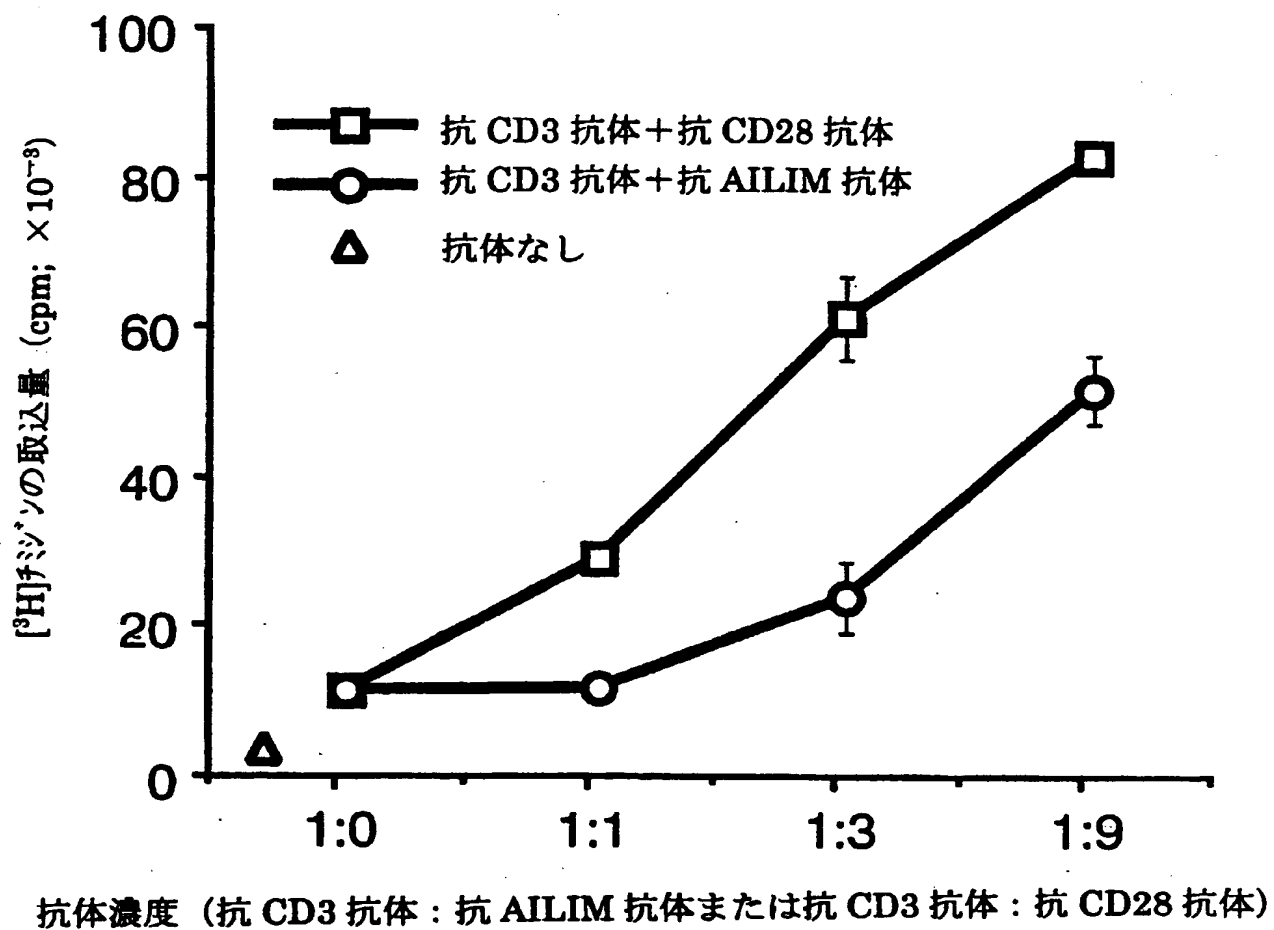
図 3 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

33/52

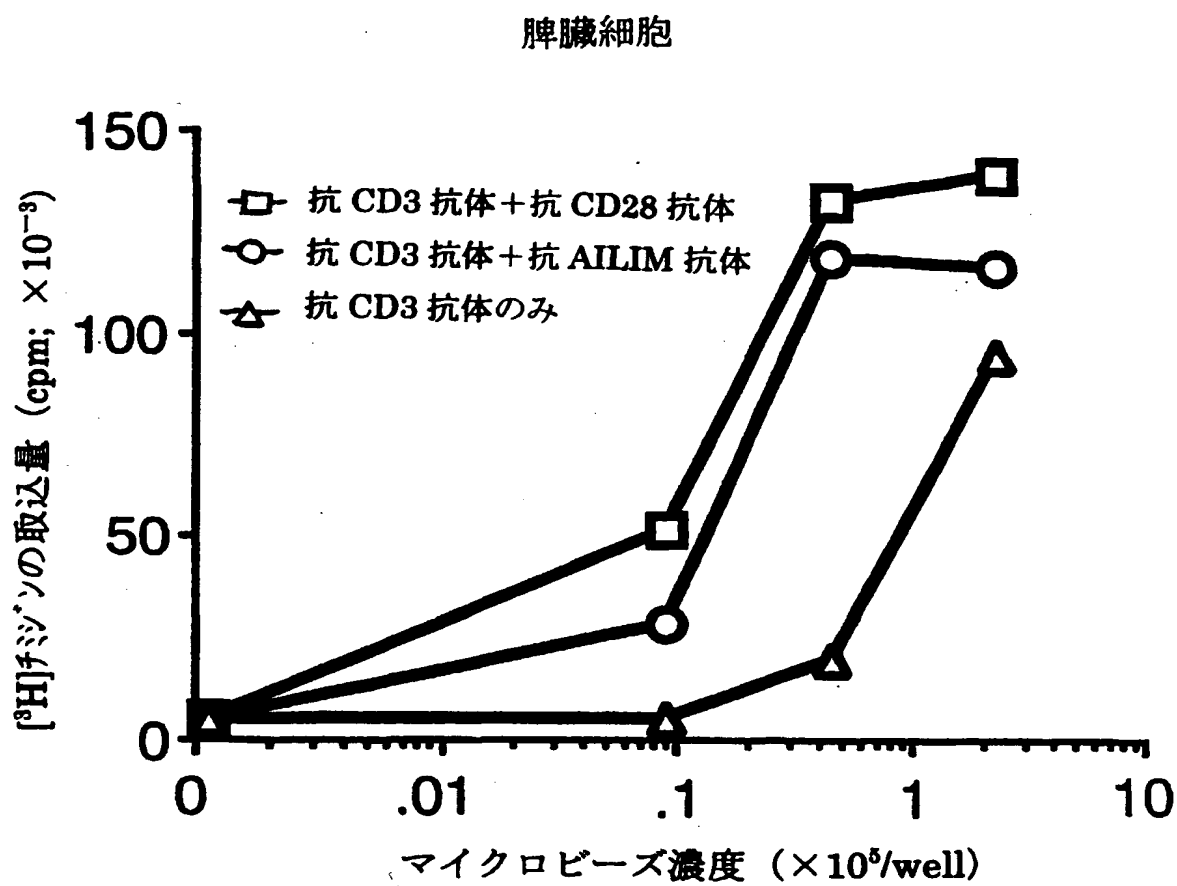
図 3 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

34 / 52

図 3 4

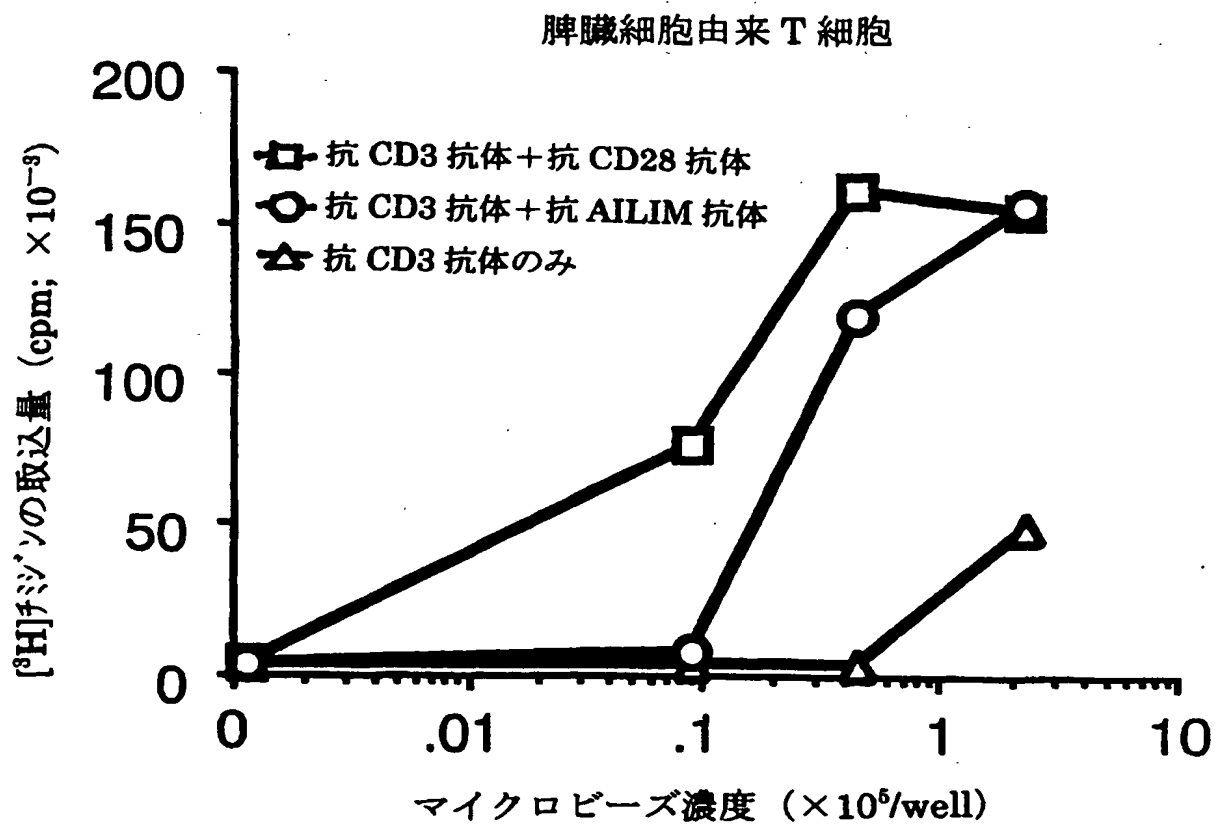


**THIS PAGE BLANK (USP)**



35/52

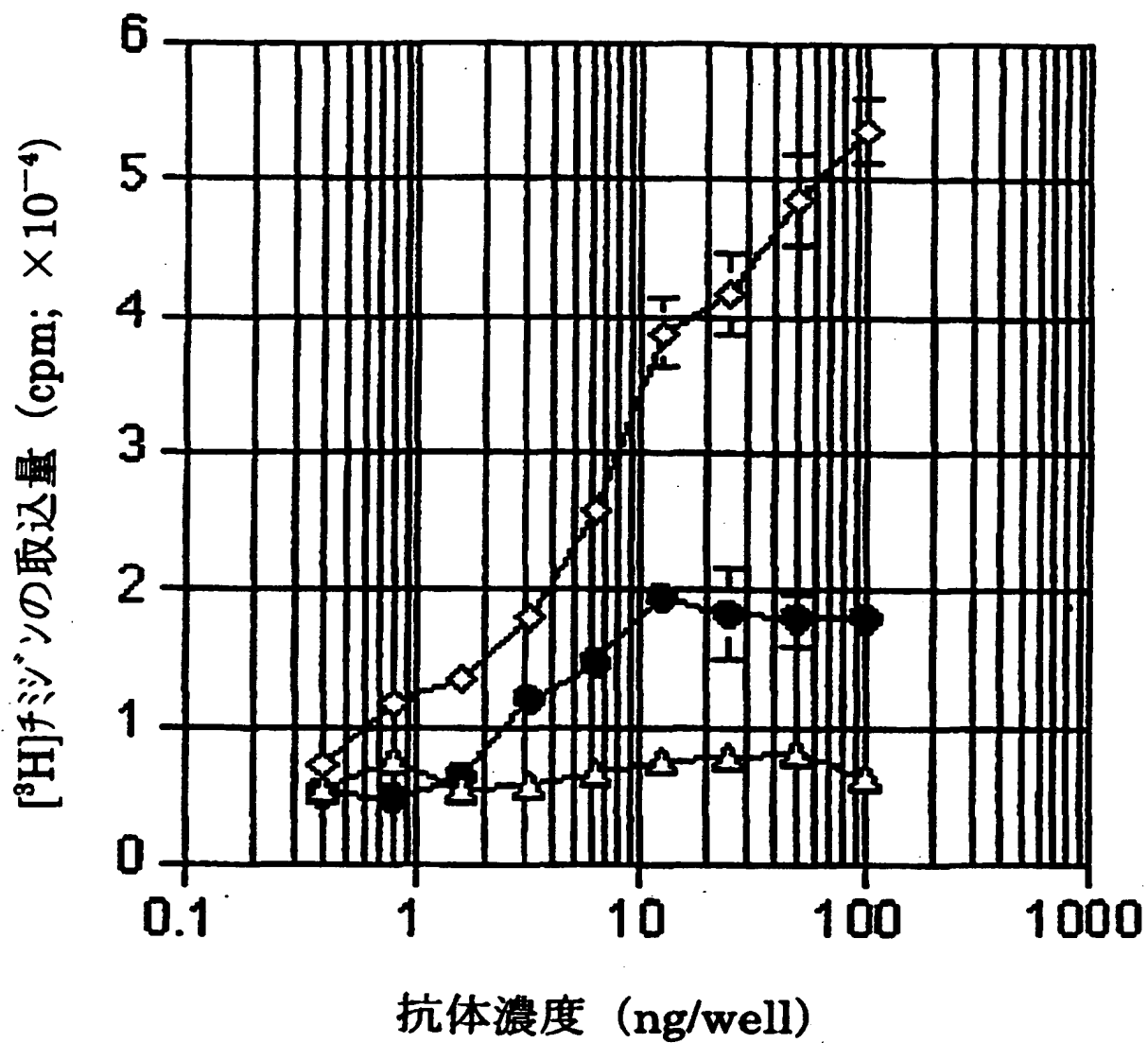
図 3 5



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

36/52

図 36



- ◇ 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体
- 抗 CD3 抗体 + 抗 AILIM 抗体
- △ 抗 CD3 抗体 + 対照抗体

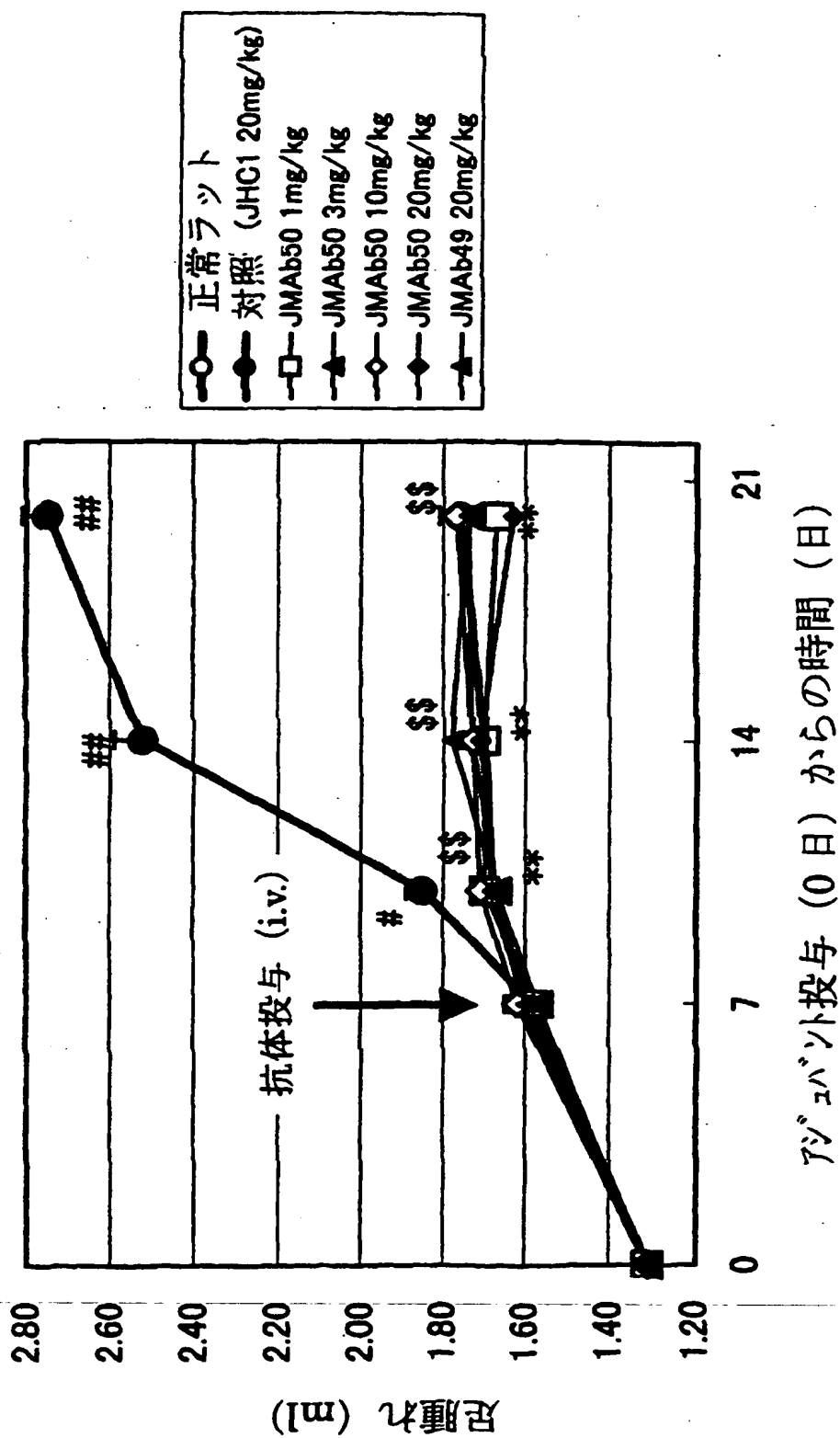
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

38/52

図 38

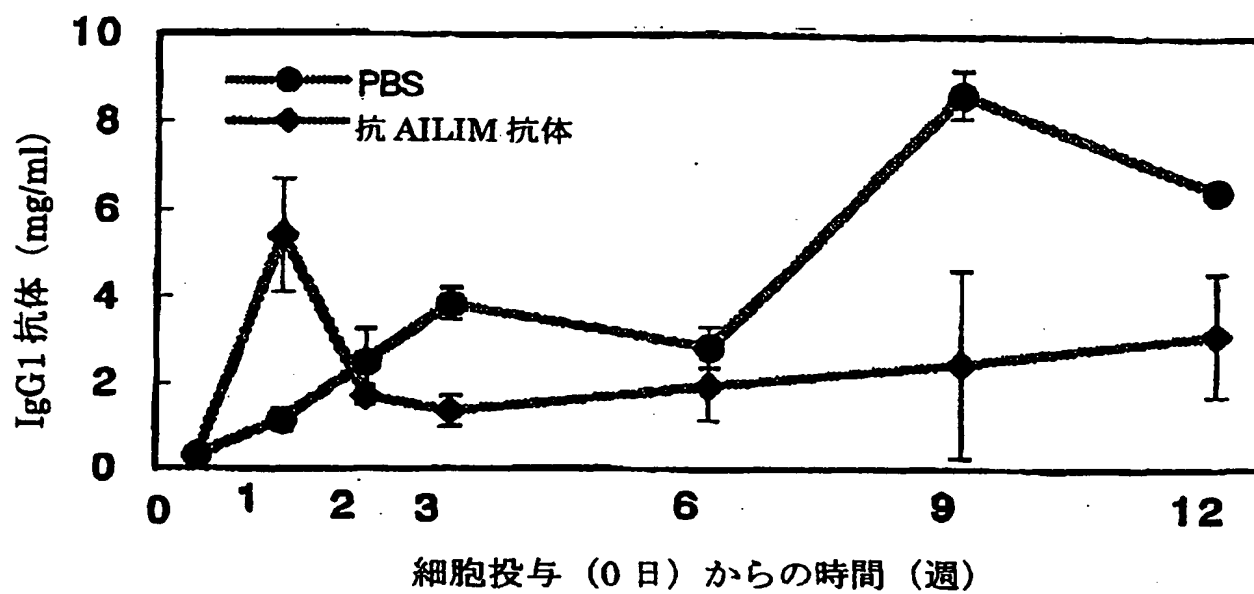


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



39/52

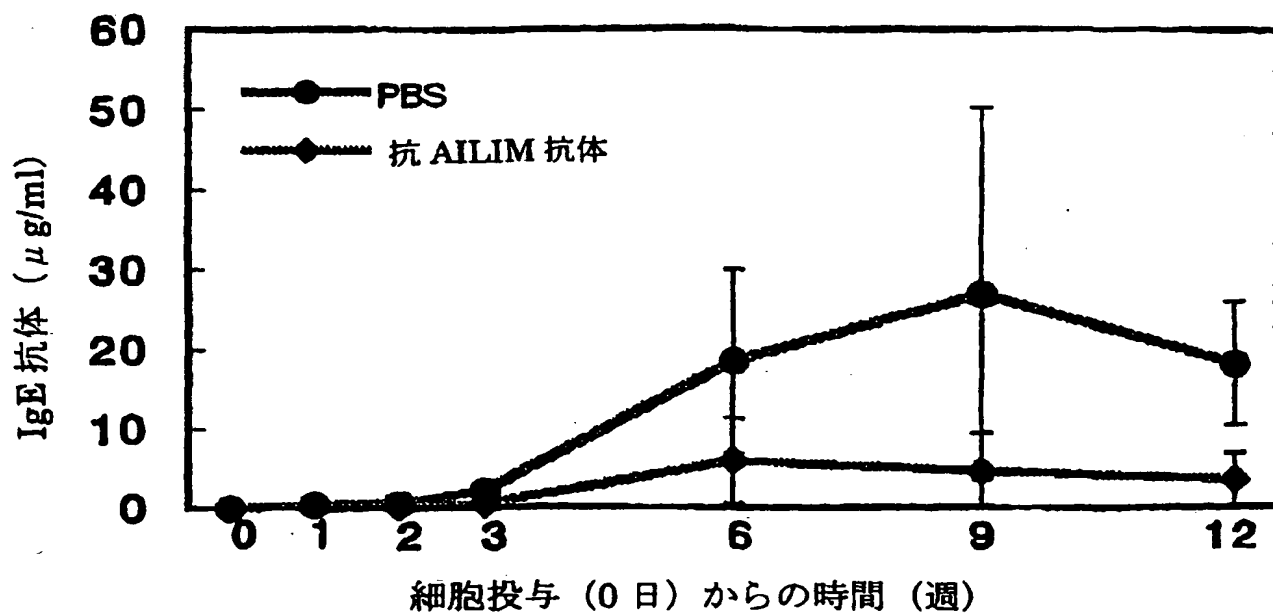
図 3 9



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

40/52

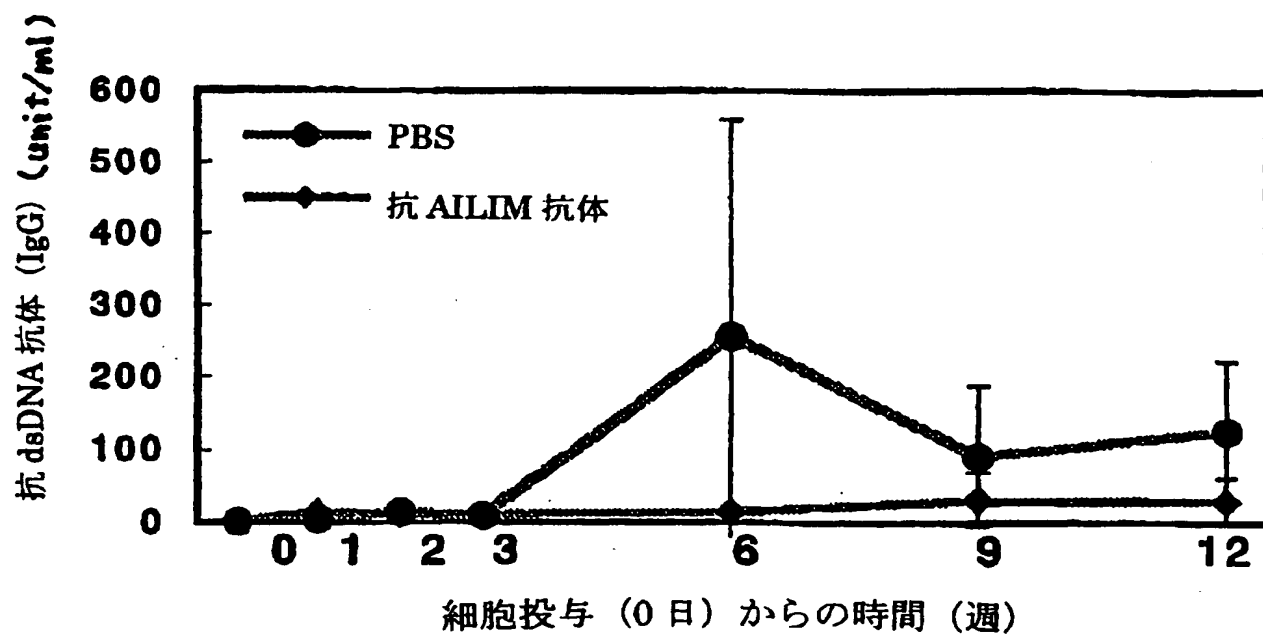
図 40



**THIS PAGE BLANK**

41/52

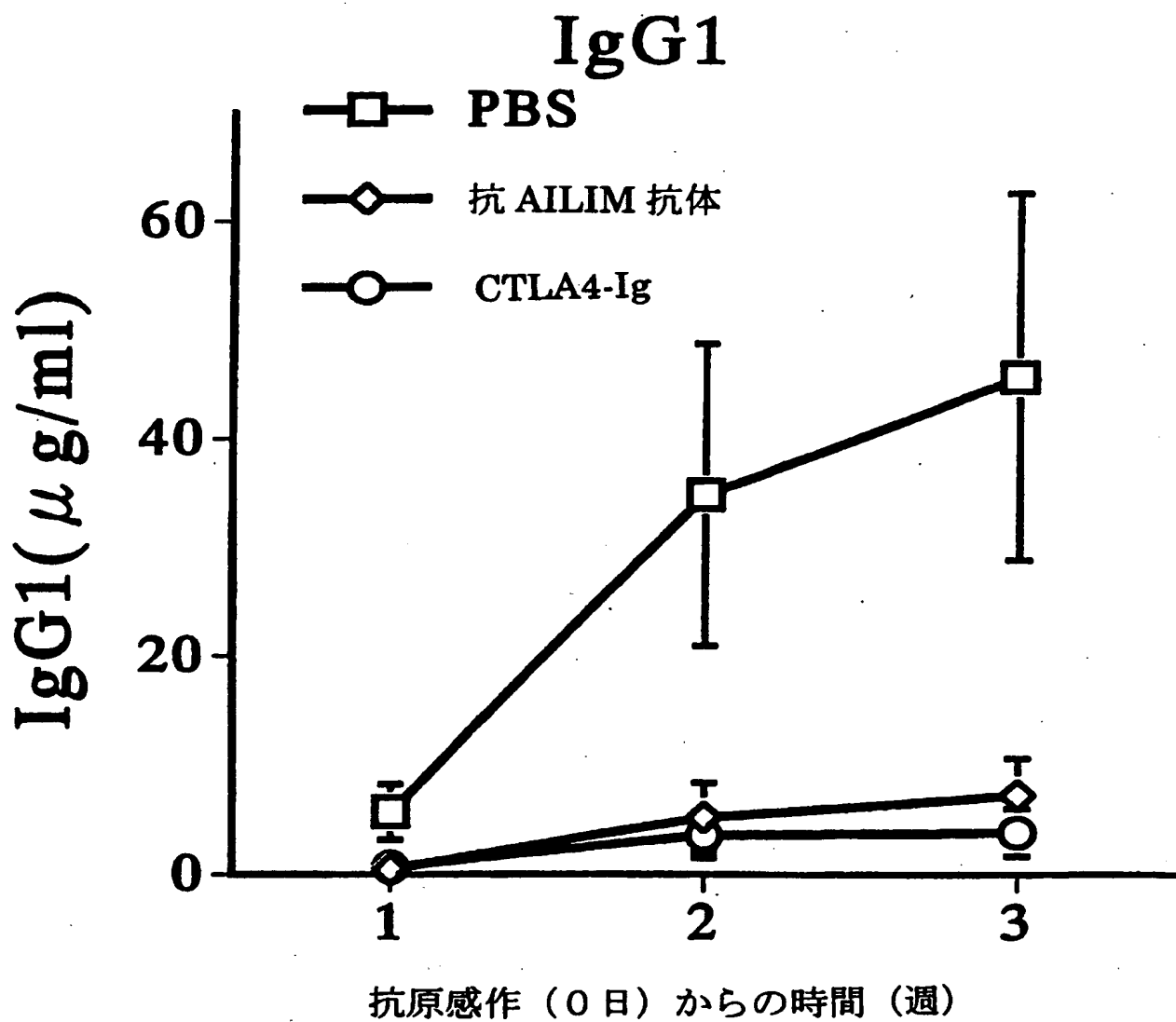
図 4 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

42/52

図 4 2

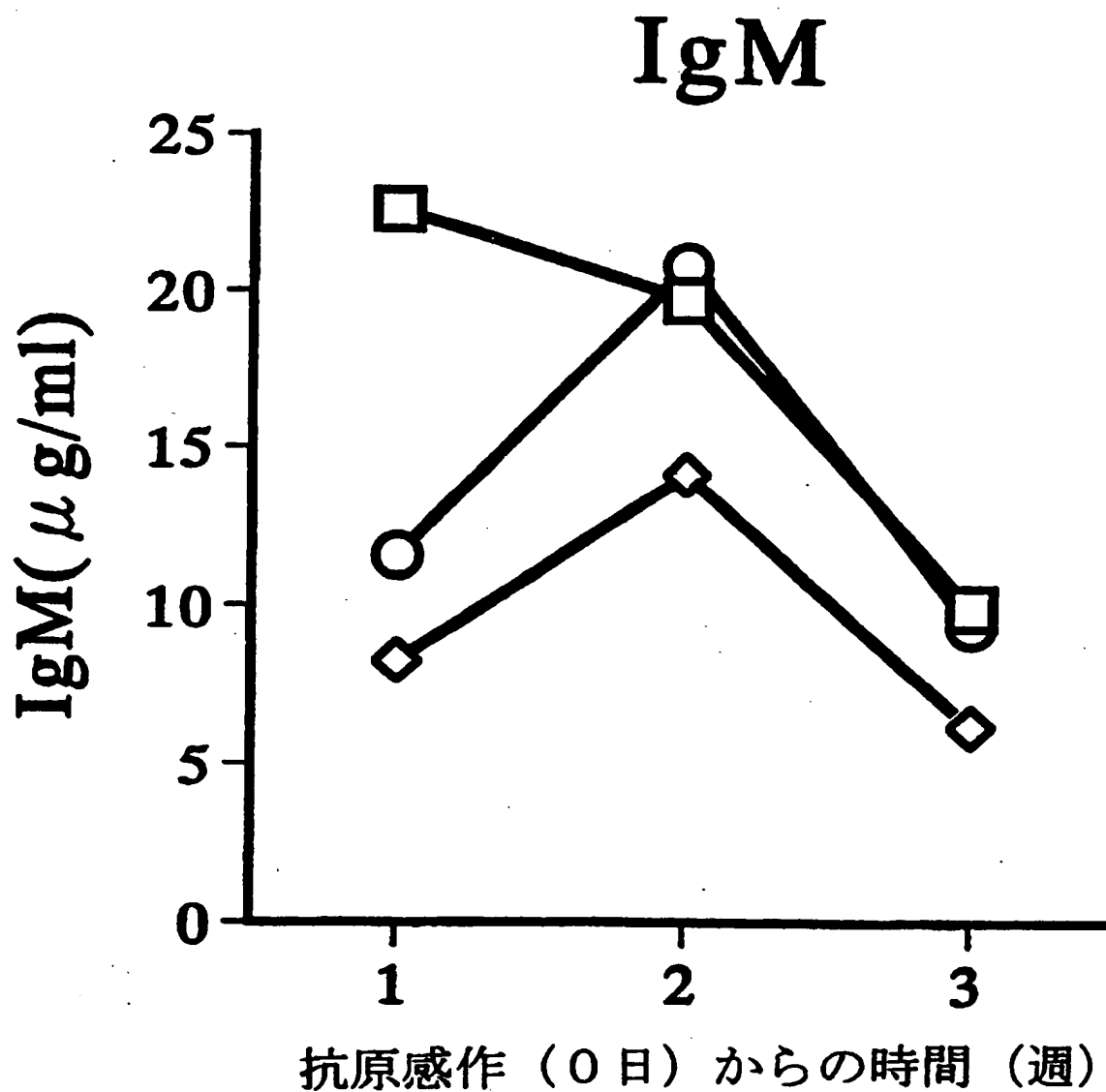





**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



43/52

図 4 3

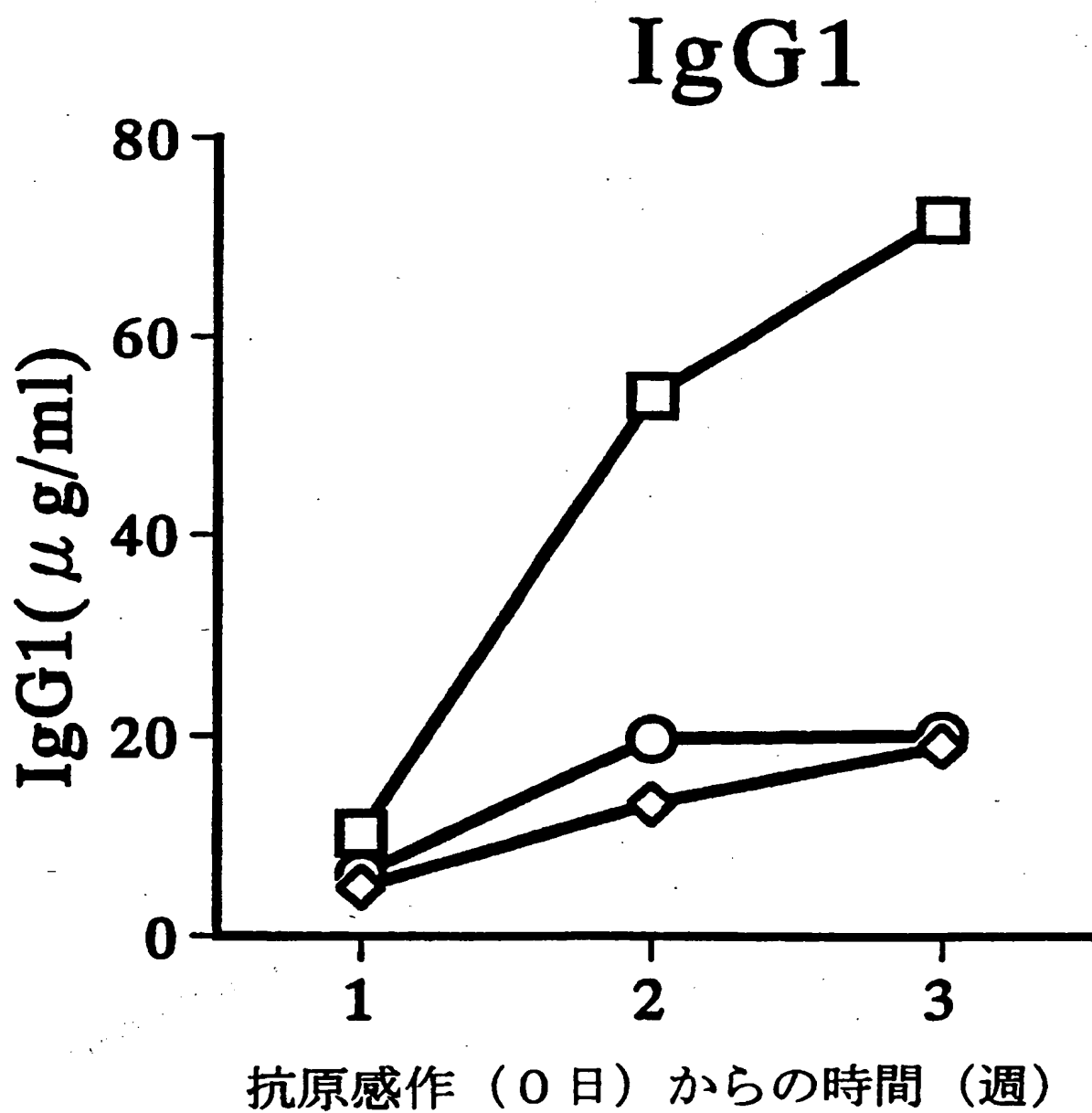





-  PBS
-  抗 AILIM 抗体(a)
-  抗 AILIM 抗体(b)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

44/52

図 4 4

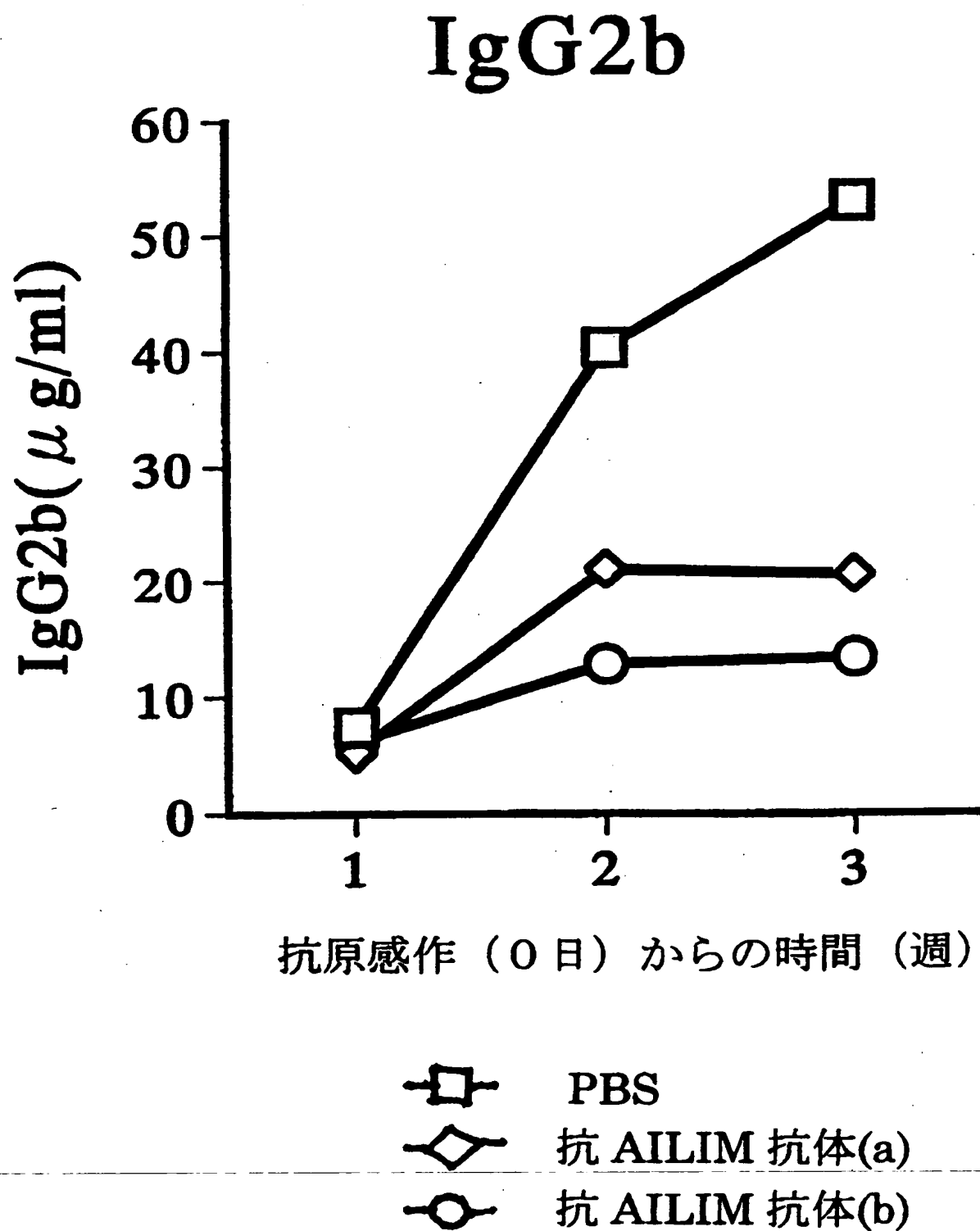


-  PBS
-  抗 AILIM 抗体(a)
-  抗 AILIM 抗体(b)

THIS PAGE BLANK (USP)

45/52

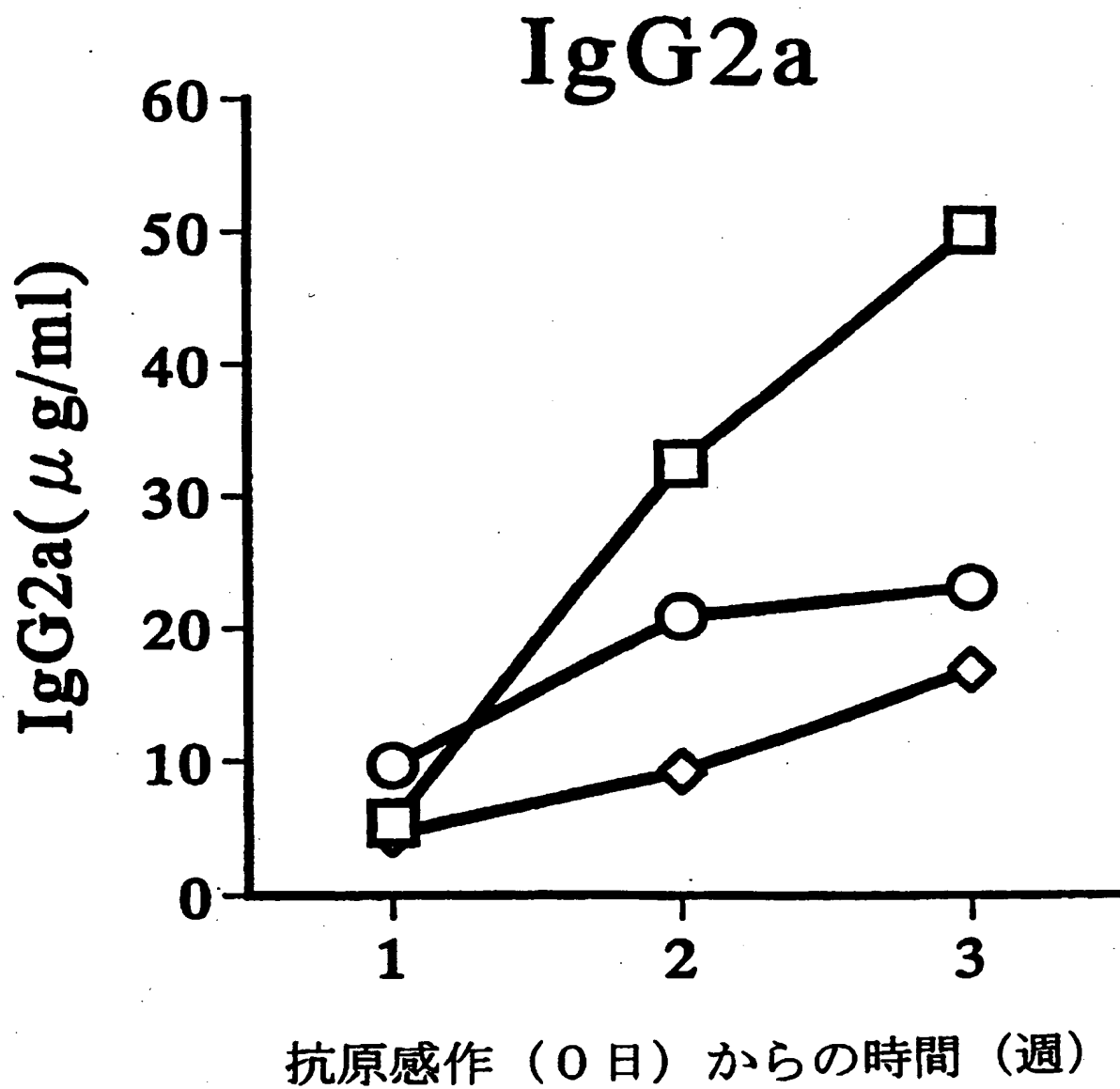
図 4 5





**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

46/52

図 4 6



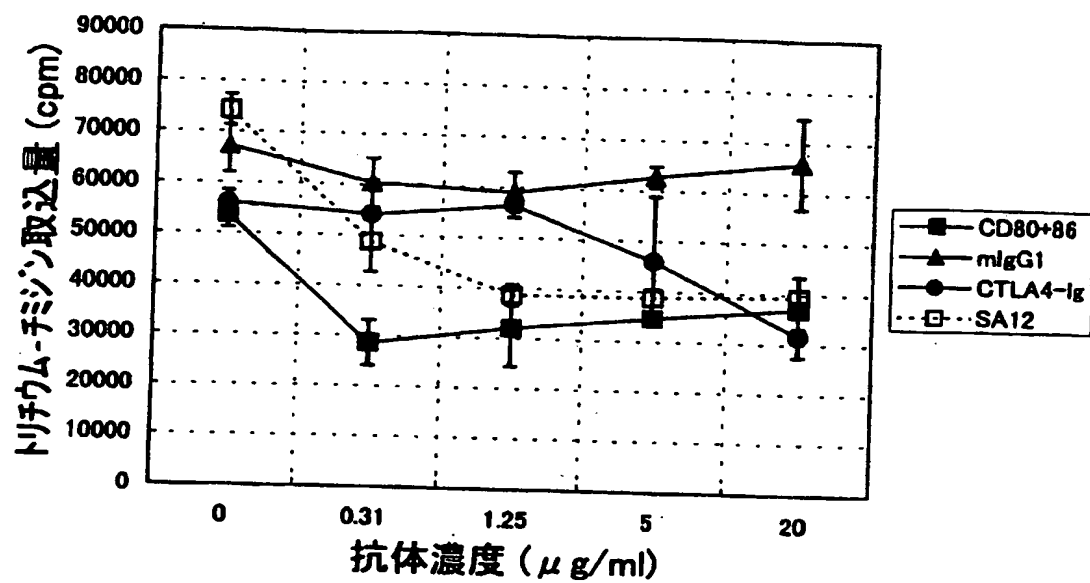
-  PBS
-  抗 AILIM 抗体(a)
-  抗 AILIM 抗体(b)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



47/52

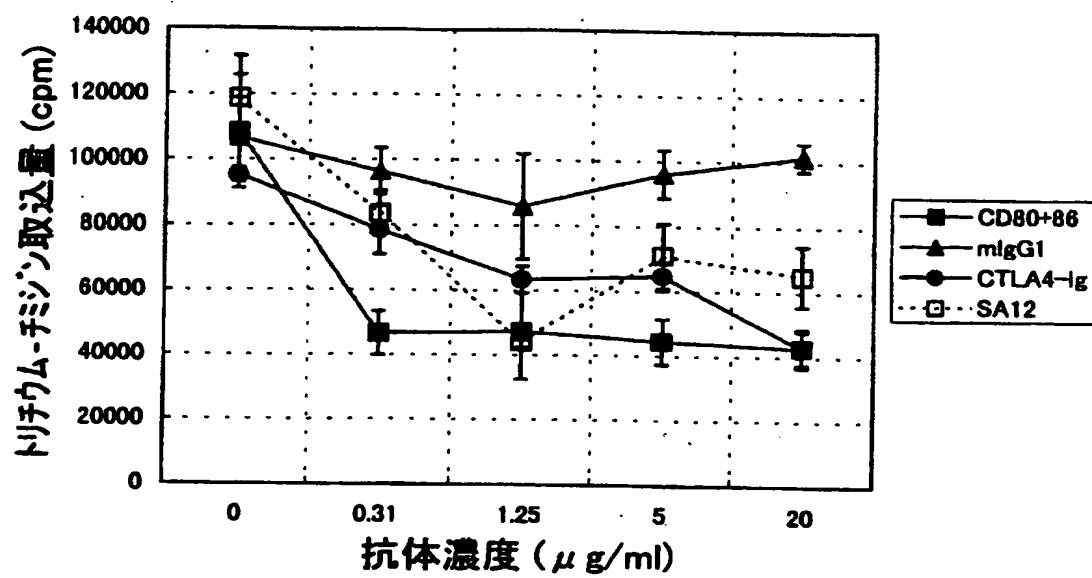
図 47



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

48 / 52

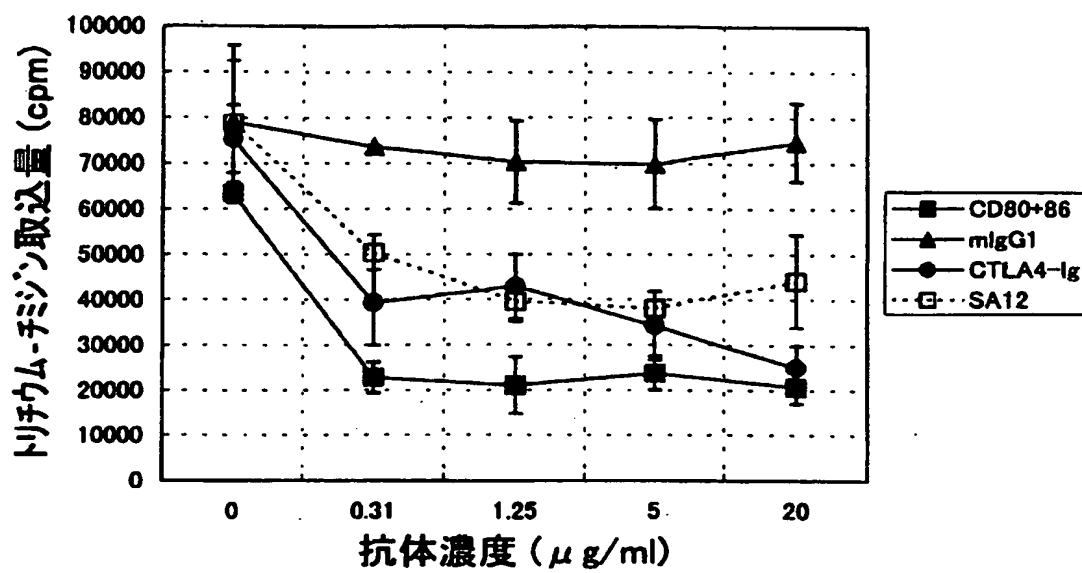
図 48



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

49/52

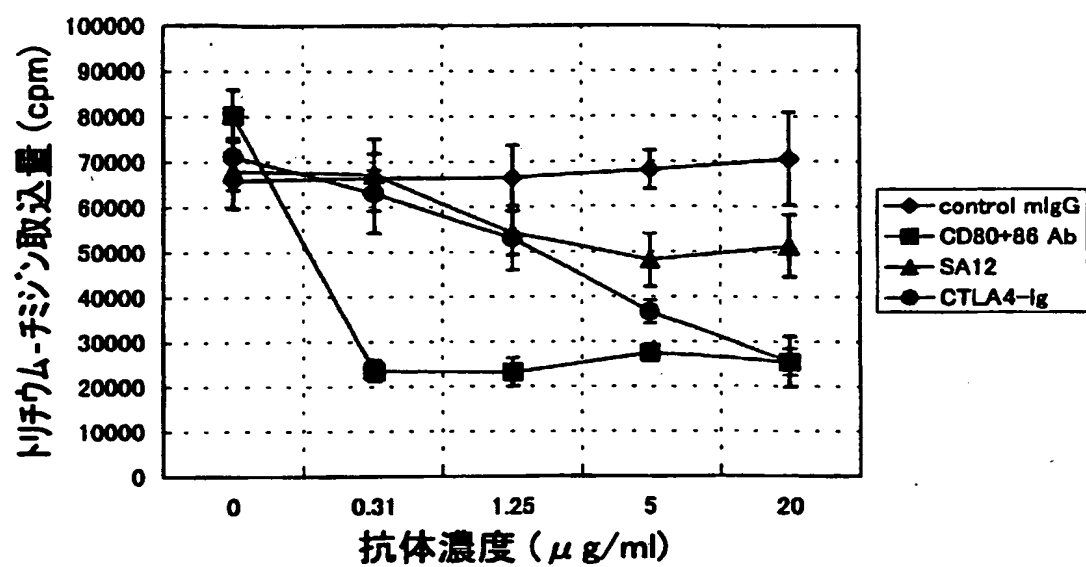
図 4 9



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

50/52

図 50

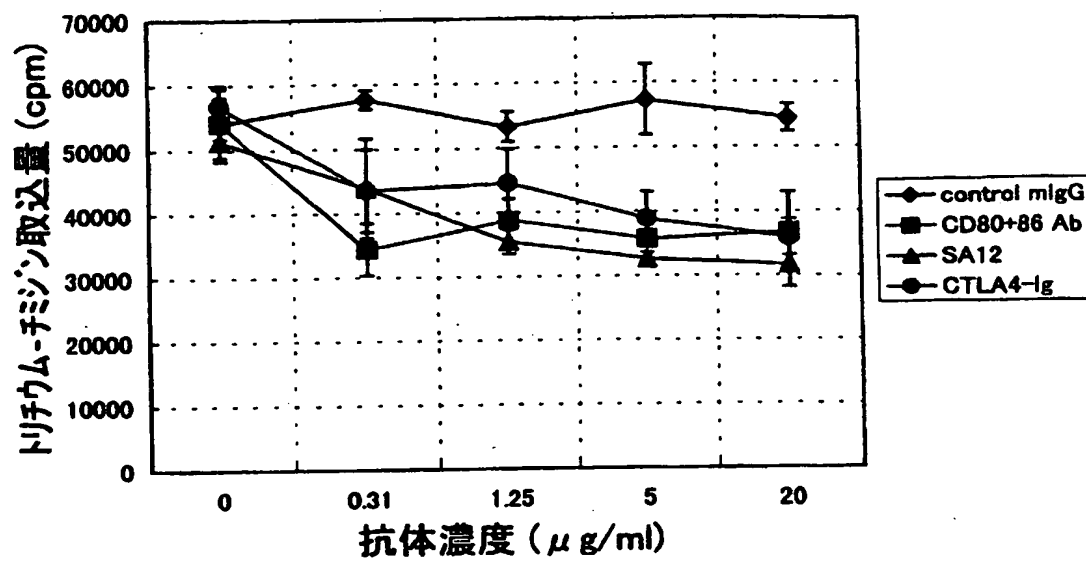


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



51/52

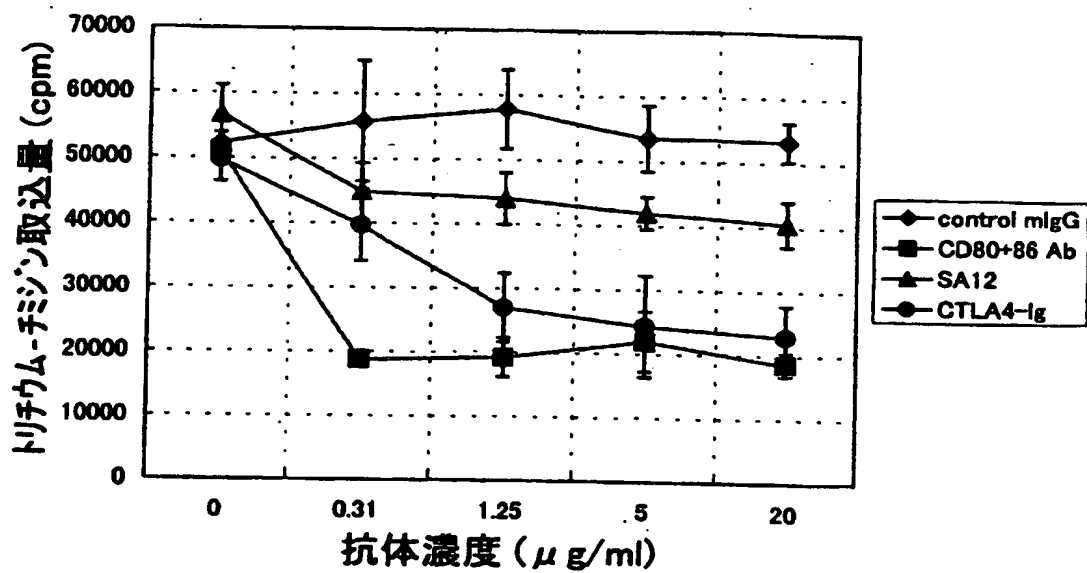
図 5 1



**THIS PAGE BLANK**

52/52

図 5 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05868

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105,  
31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105,  
31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
X	WO, 98/38216, A1 (JAPAN TOBACCO INC.), 03 September, 1998 (03.09.98), page 93, line 15 to page 95, line 23 & EP, 984023, A1 & JP, 11-029599, A & AU, 9861185, A1 & BR, 9807788, A & NO, 9904146, A	1-32
X	WO, 99/15553, A2 (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH- INSTITUTS), 01 April, 1999 (01.04.99), page 4, line 18 to page 5, line 1 & EP, 1017723, A2 & DE, 19821060, A1 & WO, 99/15553, A3 & AU, 9913320, A1	1-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is

cited to establish the publication date of another citation or other

special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

means

"P" document published prior to the international filing date but later

than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or

priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered novel or cannot be considered to involve an inventive

step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered to involve an inventive step when the document is

combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November, 2000 (17.11.00)

Date of mailing of the international search report

28 November, 2000 (28.11.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile N .

Telephone N .

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02,

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/711, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P37/06, 29/00, 19/02,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/38216, A1 (日本たばこ産業株式会社) 03. 9月. 1998 (03. 09. 98) 第93ページ 第15行-第95ページ 第23行 &EP, 984023, A1 &JP, 11-029599, A &AU, 9861185, A1 &BR, 9807788, A &NO, 9904146, A	1-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 00

国際調査報告の発送日

28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原 下 浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

9284

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 99/15553, A2 (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH- INSTITUTS) 01. 4月. 1999 (01. 04. 99) 第4ページ第18行—第5ページ第1行 &EP, 1017723, A2&DE, 19821060, A1 &WO, 99/15553, A3&AU, 9913320, A1	1-32



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

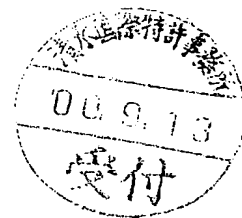
〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT/JP00/05868

RO105

P C T



## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）  
〔PCT規則20.5(c)〕

発送日（日．月．年）

12.09.00

出願人又は代理人

の書類記号

J1-A0004P

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/05868

国際出願日（日．月．年）

30.08.00

優先日（日．月．年）

30.08.99

出願人（氏名又は名称）

日本たばこ産業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、12日09月00年に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本 (出願用) - 印刷日時 2000年08月30日 (30.08.2000) 水曜日 10時31分45秒

J1-A0004P

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	J1-A0004P
I	発明の名称	免疫性疾患治療剤
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	日本たばこ産業株式会社 JAPAN TOBACCO INC. 105-8422 日本国 東京都 港区 虎ノ門二丁目2番1号 2-1, Toranomom 2-chome Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan
II-4ja	名称	
II-4en	Name	
II-5ja	あて名:	
II-5en	Address:	
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	手塚 克成 TEZUKA, Katsunari 236-0004 日本国 神奈川県 横浜市 金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内 c/o Pharmaceutical Frontier Research Laboratories of Japan Tobacco, Inc., 1-13-2, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 236-0004 Japan
III-1-4ja	氏名 (姓名)	
III-1-4en	Name (LAST, First)	
III-1-5ja	あて名:	
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

**THIS PAGE BLANK (USP)**

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月30日（30.08.2000）水曜日 10時31分45秒

J1-A0004P

III-2 111-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
111-2-2	右の指定国についての出願人である。	
111-2-4ja	氏名 (姓名)	渡部 良広
111-2-4en	Name (LAST, First)	WATANABE, Yoshihiro
111-2-5ja	あて名:	236-0004 日本国 神奈川県 横浜市 金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内
111-2-5en	Address:	c/o Pharmaceutical Frontier Research Laboratories of Japan Tobacco, Inc., 1-13-2, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 236-0004 Japan
111-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
111-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3 111-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
111-3-2	右の指定国についての出願人である。	
111-3-4ja	氏名 (姓名)	安部 良
111-3-4en	Name (LAST, First)	ABE, Ryo
111-3-5ja	あて名:	270-0101 日本国 千葉県 流山市 東深井869-17
111-3-5en	Address:	869-17, Higashifukai, Nagareyama-shi, Chiba 270-0101 Japan
111-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
111-3-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名 (姓名)	清水 初志
IV-1-1en	Name (LAST, First)	SHIMIZU, Hatsushi
IV-1-2ja	あて名:	300-0847 日本国 茨城県 土浦市 卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
IV-1-2en	Address:	Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan
IV-1-3	電話番号	0298-41-2001
IV-1-4	ファクシミリ番号	0298-41-2009

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月30日 (30. 08. 2000) 水曜日 10時31分45秒

J1-A0004P

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 橋本 一憲 HASHIMOTO, Kazunori
IV-2-1ja IV-2-1en	氏名 Name(s)	
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国で ある他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権 機構と特許協力条約の締 約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張	
VI-1-1	先の出願日	1999年08月30日 (30. 08. 1999)
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-242672
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先権 主張	
VI-2-1	先の出願日	2000年08月24日 (24. 08. 2000)
VI-2-2	先の出願番号	特願2000-254680
VI-2-3	国名	日本国 JP
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月30日（30.08.2000）水曜日 10時31分45秒

J1-A0004P

VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	83	-
VIII-3	請求の範囲	5	-
VIII-4	要約	1	abst. txt
VIII-5	図面	52	-
VIII-7	合計	145	
	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-14	寄託した微生物又は生物材料に関する書面	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名 (姓名)	清水 初志	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名 (姓名)	橋本 一憲	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

**THIS PAGE BLANK (USE)**

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)
0-1-1		
0-2	国際出願番号.	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	J1-A0004P
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	51
1-2	行	13-17
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1996年10月11日 (11.10.1996)
1-3-4	受託番号	NIBH BP-5707
1-4	追加の表示	なし (NONE)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	記載頁	51
2-2	行	13-17
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3
2-3-3	寄託の日付	1996年10月11日 (11.10.1996)
2-3-4	受託番号	NIBH BP-5708
2-4	追加の表示	なし (NONE)
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)
受理官庁記入欄		
0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	

**THIS PAGE BLANK (USP)**

0-4-1	権 限のあ る職員	
-------	-----------	--

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理 された日	
0-5-1	権 限のあ る職員	

**THIS PAGE BLANK (USP)**

# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

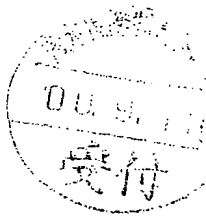
殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T



## 手続補正命令書

（法第6条、法施第30条）  
〔PCT3条（4）（i）14条（1）、規則26〕

PCT/JP00/05868

RO106

		発送日（日、月、年）	12.09.00
出願人又は代理人 の書類記号	J1-A0004P	応答期間	発送日から 1箇月以内
国際出願番号	PCT/JP00/05868	国際出願日（日、月、年）	30.08.00
出願人（氏名又は名称） 日本たばこ産業株式会社			

出願人は、上記期間内に手続きの補正をしなければならない。補正すべき事項は、次の附属書に記載されている。

☒ 附属書A

☐ 附属書B

☒ 附属書C

（注意）

### 補正の方法

手続補正書に補正事項を補正した差替え用紙を添付することにより行う。また、手続補正書の「補正内容」の欄に差替えられる用紙と差替え用紙との相違について記載する。なお、補正によって書き換えられる用紙の明瞭さ及び直接複製の可能性に悪影響を及ぼすことなく手続補正書の「補正内容」の欄から記録原本への書き換えが容易にできる場合には差替え用紙を省略することができる。

（PCT規則26.4（a）、法施行規則様式第15備考4参照）

### 注意

補正がされないときは、国際出願は取り下げられたものとみなす旨の決定がされる。

（法第7条第1項、PCT規則26.5参照）

この手続補正命令書の写し及び附属書の写しは、国際事務局

☐ 及び国際調査機関

に、送付した。

<p>名称及びあて名</p> <p>日本国特許庁（RO/JP）</p> <p>郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308</p> <p>日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p> <p>様式PCT/RO/106（1998年7月）</p>	<p>権限のある職員</p> <p>特許庁長官</p>
---	-----------------------------

THIS PAGE BLANK



国際出願について次の不備を発見した。

1. 願書の記名押印について

- a. ☐ 提出者の氏名又は名称の記載又は押印がない。
- b. ☐ 出願人全員の氏名又は名称の記載又は押印がない。
- c. ☐ 米国の出願人について、押印の欠如に関する説明書の添付がない。
- d. ☐ 代理人又は共通の代表者の氏名の記載及び押印はあるが、次の理由により認めることはできない。
  - ☐ 願書に代理人又は共通の代表者の選任を証明する書面の添付がない。
  - ☐ 願書に代理人又は共通の代表者の選任を証明する書面の添付があるが、次の出願人による代理人又は共通の代表者の選任を証明する書面の添付がない。
- e. ☐ その他

\* 発明者であっても出願人となる場合は、記名押印が必要である。(例：米国を指定した場合)

2. 願書の出願人に関する表示について

- a. ☐ 出願人の氏名又は名称が正しく記載されていない。
- b. ☐ 出願人のあて名が記載されていない。
- c. ☐ 出願人のあて名が正しく記載されていない。
- d. ☐ 出願人の国籍が記載されていない。
- e. ☐ 出願人の住所（居住者である国の国名）が記載されていない。
- f. ☐ その他

3. 国際出願の言語について

- a. ☐ 願書が日本語により作成されていない。
- b. ☐ 図面の説明の部分が日本語により作成されていない。
- c. ☐ 要約が日本語により作成されていない。

4. 発明の名称について

- a. ☐ 願書の第 I 欄に記載されていない。
- b. ☐ 明細書の最初の用紙の冒頭に記載されていない。
- c. ☐ 願書の第 I 欄に記載のものと、明細書の冒頭に記載のものが相違する。

5. 要約書について

- ☐ 国際出願に要約書が含まれていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図面は、特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律施行規則第30条第1項第3号に規定する要件に適合しない。

国際出願の図面について次の不備を発見した。

I. 図面の用紙に関して

- a. ☐ 用紙が直接複製することができない。
- b. ☐ 用紙に折り目、しわ、裂け目がある。
- c. ☐ 用紙の両面が用いられている。
- d. ☐ 用紙が可撓性のある／丈夫な／白色の／滑らかな／光沢のない／耐久性のあるものではない。
- e. ☐ 図面が別の用紙で作成されていない。
- f. ☐ 用紙が所定のとり方ではない。
- g. ☐ 用紙の大きさが日本工業規格A列4番の大きさではない。(横21cm、縦29.7cm)
- h. ☐ 用紙の余白が所定のとり方ではない。(最少：上端2.5cm、左端2.5cm、右端1.5cm、下端1cm)
- i. ☐ 用紙に記載されている出願人又は代理人の書類記号が用紙の上端の余白の左隅であって上端から1.5cm以内に記載されていない。
- j. ☐ 出願人又は代理人の書類記号が12字を超えている。
- k. ☐ 用紙の使用することができる面又は使用した面の周囲に枠が記載されている。
- l. ☐ 用紙にアラビア数字により連続した番号が付されていない。(例：1/3、2/3、3/3)
- m. ☐ 用紙の番号が用紙の上端又は下端の中央に付されていない。
- n. ☐ 用紙の番号が余白内に記載されている。(余白には記載できない。h参照)
- o. ☐ 用紙に訂正／重ね書き／行間挿入／削除箇所が多く行われている。
- p. ☐ 用紙に複写の際のよごれがある。

II. 図面に関して

- a. ☐ 図面が直接複製することができない。
- b. ☐ 不必要な記載事項がある。
- c. ☐ 図面の語句が翻訳された場合に、図面の線にかかるような記載がある。
- d. ☐ 耐久性のある、黒色の、十分に濃厚な濃墨等を用い、太さの均一な、かつ、明瞭な線で着色することなく作成されていない。
- e. ☐ 平行斜線によらない切断面がある。
- f. ☐ 縮尺による写真複製をしたときに容易に識別できない記載がある。
- g. ☐ 図式によらない尺度が記載されている。
- h. ☐ 簡潔かつ明瞭でない数字、文字、引出線がある。
- i. ☐ 製図用具を用いることなしに引かれた線がある。
- j. ☐ 図中の他の要素に対し妥当でない比率で記載した図がある。
- k. ☐ 0.32cm以下の大きさの数字又は文字がある。
- l. ☐ ローマ字及び慣習となっているギリシャ文字以外の文字の記載がある。
- m. ☐ 2以上の用紙に描かれた図であって単一の完全な図を得るように用紙を合わせたときに隠れる部分がある。
- n. ☐ 適切に配置されていない図がある。
- o. ☐ 個々の図に連続したアラビア数字による番号が付されていない。
- p. ☐ 用紙の番号と関係のある番号が付されている図がある。
- q. ☐ 明細書に用いていない引用符号が記載されている。
- r. ☐ 明細書に用いられている引用符号の記載がない。
- s. ☐ 異なった引用符号により表示された同一の部分がある。

(注意)

THIS PAGE BLANK (US)